

**Remediación biótica y abiótica de un suelo contaminado con cobre, cinc y cromo.  
Monitoreo biológico.**

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,  
Área Ciencias Agropecuarias*

**Agustina Branzini**

Licenciada en Ciencias Biológicas - FCEN - Universidad de Buenos Aires- 2005

Facultad de Agronomía: Cátedra de Fertilidad y Fertilizantes



**FAUBA**

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano

Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



## COMITÉ CONSEJERO

Director de Tesis

**Marta Susana Zubillaga**

Ingeniera Agrónoma (FAUBA, UBA)

MSci. en Ciencias del Suelo (UBA)

Doctora en Toxicología de Suelos (FVET, UBA)

Doctora en Ciencias y Tecnología Ambiental (Universidade Da Coruña, España)

Consejero de Estudios

**Raúl Silvio Lavado**

Ingeniero Agrónomo (FAUBA, UBA)

Diplomado en Edafología y Biología Vegetal (Universidad de Granada, España)

## JURADO DE TESIS

Director de Tesis

**Marta Susana Zubillaga**

Ingeniera Agrónoma (FAUBA, UBA)

MSci. en Ciencias del Suelo (UBA)

Doctora en Toxicología de Suelos (FVET, UBA)

Doctora en Ciencias y Tecnología Ambiental (Universidade Da Coruña, España)

JURADO

**Elizabeth Agostini**

Licenciada en Bioquímica (Universidad Nacional de San Luis)

Doctor en Cs. Biológicas (Universidad Nacional de Río Cuarto)

JURADO

**Edgardo Donati**

Licenciado en Ciencias Químicas (Universidad Nacional de La Plata)

Doctor en Ciencias Químicas (Universidad Nacional de La Plata)

JURADO

**María del Pilar Bernal Calderón**

Licenciada en Ciencias Químicas (Universidad de Murcia)

Doctor en Ciencias Químicas (Universidad de Murcia)

**Fecha de defensa de la Tesis: 21 de octubre de 2014**

## Dedicatoria

*A mis papás, a mis hermanas, a mis sobrinos, y mis queridos abuelos y tíos, y especialmente a Diego.*

## Agradecimientos

*A la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires por darme la oportunidad y el espacio de realizar mis estudios de posgrado, al Laboratorio de Suelos y Ambiente del Instituto Nacional de Politecnicultura (Nancy, Francia), al Laboratorio de Biología de Suelos y Materia Orgánica del Instituto de Agronomía (UFRRJ, Seropédica, Brasil), al Dr. Eduardo Mondino por transmitirme sus conocimientos, a mis compañeros de la Cátedra de Fertilidad de Suelos, a mis amigas cosechadas a lo largo de mi estadía en la Cátedra y a mi directora, por todo el soporte, comprensión, oportunidades, confianza y ese algo más que me brindó durante todo el proceso de formación.*

**Declaración:** Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor entender, original producto de mi propio trabajo, y que este material no lo he presentado, en formato parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.\*

---

\* Financiamiento para realizar la tesis: UBACyT G90.

### Publicaciones derivadas de la Tesis

Branzini A. y Zubillaga, M.S. Valoración de residuos orgánicos por procesos aeróbicos. Pp. 528-537 en Pascale, C., Taboada, M.A. y Zubillaga M.M. (eds.) Suelos, Producción Agropecuaria y Cambio Climático: Avances en la Argentina. Capítulo 39. MAGyP, Argentina.

Branzini A. y Zubillaga, M.S. 2013. Phytostabilization as Soil Remediation Strategy. Pp. 177-198 en D.K. Gupta (ed.) Plant-Based Remediation Processes. Capítulo 10. Soil Biology 35, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Branzini, A., Santos González, R.S. y Zubillaga, M.S. 2012. Absorption and translocation of cooper, zinc and chromium by *Sesbania virgata*. Journal of Environmental Management, 102: 50-54. ISSN: 0301-4797.

Branzini, A., y Zubillaga, M.S. 2012. Comparative use of soil organic and inorganic amendments in heavy metals stabilization. Applied and Environmental Soil Science. Article ID 721032, pp 1-7. doi:10.1155/2012/721032 ISSN: 1687-7667.

Branzini, A. y Zubillaga, M.S. 2012. Remediación y monitoreo de suelos contaminados con metales pesados. Enmiendas orgánicas e inorgánicas para remediar suelos contaminados con metales pesados. Ed. Editorial Academica Española, LAP LAMBERT. Alemania. 58 p.

Branzini, A. y Zubillaga, M.S. 2010. Assessing Phytotoxicity of Heavy Metals in Remediated Soil. International Journal of Phytoremediation, 12: 335-342. ISBN 1549-7879 (online) /1522-6514 (paper). DOI: 10.1080/15226510902968126.

<b>Capítulo 1: Introducción general</b>	1
Objetivo general	11
Esquema resumen de la Tesis	12
Aporte de la Tesis	12
<b>Parte A: Estudios sobre <i>Sesbania sp.</i></b>	
<b>Capítulo 2: Variación de la fitotoxicidad del suelo contaminado con metales pesados mediante el agregado de enmiendas. Estudio preliminar de especies tolerantes</b>	
<b>2.1. INTRODUCCION</b>	14
Objetivo e hipótesis	18
<b>2.2. MATERIALES Y METODOS</b>	19
2.2.a Producción y testeo de la fitotoxicidad del compost de biosólido	19
2.2. b. Bioensayo de fitotoxicidad de suelo	21
2.2.c. Análisis químicos	25
2.2.c. Análisis estadístico	25
<b>2.3. RESULTADOS</b>	26
2.3.a. Toxicidad de compost de biosólido, en muestras de diferente grado de madurez	26
2.3. b. Bioensayo de fitotoxicidad de suelo	29
2.3. c. Características químicas de suelos y extractos	35
<b>2.4. DISCUSION</b>	39
2.4.a. Producción y testeo de la fitotoxicidad del compost de biosólido	39
2.4. b. Bioensayo de fitotoxicidad del suelo	40
2.4.c. Características químicas de los sustratos y extractos	42
<b>2.5. CONCLUSIONES</b>	44
<b>Capítulo 3: Interacciones sinérgicas y antagónicas en mezclas binarias de metales pesados</b>	
<b>3.1. INTRODUCCION</b>	47
Objetivos e Hipótesis	51
<b>3.2. MATERIALES Y METODOS</b>	52
3.2.a. Experimento en suelo	53
3.2.b Experimento en hidroponía	55
3.2.c. Absorción y traslocación por la planta	56
3.2.d. Análisis químicos en ambos experimentos	57
<i>Experimento en suelo</i>	57
<i>Experimento en hidroponía</i>	58
3.2.e. Análisis estadístico	59
<b>3.3. RESULTADOS</b>	59
4.3.a. Experimento en suelo	59
4.3.b. Experimento en hidroponía	65
<b>3.4. DISCUSION</b>	70
3.4.a. Experimento en suelo	70
3.4.b. Experimento en hidroponía	74
<b>3.5. CONCLUSIONES</b>	77
<b>Parte B: Estrategias químicas y biológicas de remediación</b>	
<b>Capítulo 4: Fitorremediación asistida</b>	
<b>4.1. INTRODUCCION</b>	80
4.1.a. Estrategias de Remediación	80
4.1.a1. Estrategias químicas: Enmiendas inorgánica y orgánica	80
Enmienda inorgánica: Fertilizante fosfatado	81
Enmienda orgánica: Compost de biosólido	82
4.1.a2. Estrategias biológicas: Fitorremediación con <i>Sesbania</i>	83
4.1.a3. Combinación de estrategias: enmiendas – planta remediadora	84

4.1.b. Especiación de metales pesados	85
Objetivos e Hipótesis	86
<b>4.2. MATERIALES Y METODOS</b>	88
4.2.a. Experimento en invernáculo	88
4.2.b. Análisis químicos en suelo y planta	90
4.2.c. Análisis de muestras con Microscopía de Transmisión Electrónica	92
4.2.d. Análisis estadístico	94
<b>2.3. RESULTADOS</b>	95
4.3.a. Efecto de las estrategias de remediación en la distribución de metales pesados	95
4.3.b. Eficiencia de la fitorremediación con especies nativas de <i>Sesbania</i>	101
4.3.c. Especiación de metales pesados	106
<b>2.4. DISCUSION</b>	109
4.4.a. Efecto de las estrategias de remediación en la distribución de metales pesados	109
4.4.b. Eficiencia de la fitorremediación con especies nativas de <i>Sesbania</i>	113
4.4.c. Especiación de metales pesados	114
<b>2.5. CONCLUSIONES</b>	115

## Parte C: Monitoreo de la remediación

### Capítulo 5: Monitoreo de las propiedades biológicas del suelo remediado mediante estrategias químicas y biológicas. Uso de bioindicadores de la calidad del suelo.

<b>5.1. INTRODUCCION</b>	118
5.1.a. Microorganismos del suelo	120
5.1.b. Nematodos del suelo	122
5.1.c. Glomalina del suelo	125
Objetivos e Hipótesis	127
<b>5.2. MATERIALES Y METODOS</b>	129
5.2.a. Experimento de liberación de C-CO <sub>2</sub> por la biota del suelo	130
5.2.b. Experimento de extracción, cuantificación e identificación de nematodos de vida libre	131
5.2. b.1 Extracción de nematodos	132
5.2. b.2 Identificación de Grupos Tróficos	133
5.2. c. Experimento de extracción y cuantificación de Glomalina	136
5.2. d. Análisis químicos en los experimentos	136
5.2. e. Análisis estadístico	137
<b>5.3. RESULTADOS</b>	138
5.3.a. Experimento de liberación de C-CO <sub>2</sub> por microorganismos	138
5.3.b. Experimento de extracción, cuantificación e identificación de nematodos de vida libre	142
5.3.b.1. Índices ecológicos	146
5.3.c. Experimento de extracción y cuantificación de glomalina	148
<b>5.4. DISCUSION</b>	152
5.4.a. Experimento de liberación de C-CO <sub>2</sub> por microorganismos	152
5.4.b. Experimento de extracción, cuantificación e identificación de nematodos de vida libre	154
5.4.b.1. Índices ecológicos	156
5.4.c. Experimento de extracción y cuantificación de glomalina	157
<b>5.5. CONCLUSIONES</b>	159
<b>Capitulo 6. Discusión General</b>	160
6.1. Principales contribuciones de la tesis al avance del conocimiento	165
6.2. Potenciales líneas de investigación	166

<b>BIBLIOGRAFIA</b>	169
---------------------	-----

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Esquema representativo del suelo como ecotono entre distintos medios del sistema.	2
Figura 1.2 Dinámica de los MP en el suelo, adaptado de Pierzynski et al., 2005.	5
Figura 1.3 Esquema general de descontaminación del suelo contaminado con MP en un proceso natural de fitorremediación, adaptado de Singh et al., 2003.	10
Figura 2.2.b.1 Representación del bioensayo de germinación de semillas de <i>S. punicea</i> y <i>S. virgata</i> , y sus resultados luego del período de incubación.	24
Figura 2.3.b.1 Tasa media de germinación luego de transcurridas las 168 hs del bioensayo de germinación, para <i>S. punicea</i> y <i>S. virgata</i> .	30
Figura 3.3.1 Concentración total de Cu, Zn y Cr en tejidos de plantas de <i>S. virgata</i> , según los distintos niveles de concentración y combinaciones de MP en el suelo.	60
Figura 3.3.2 Efectos del estrés producido por MP en la biomasa total de <i>S. virgata</i> , y contenido de humedad de las plantas.	64
Figura 3.3.3 Concentración total de Cu, Zn y Cr en tejidos de plantas de <i>S. virgata</i> , según los distintos niveles de concentración y las distintas combinaciones de MP en la solución hidropónica.	66
Figura 3.3.4 Efectos del estrés por MP en biomasa total de <i>S. virgata</i> en solución hidropónica, e Índice de Tolerancia de <i>Sesbania</i> expresado como el porcentaje relativo al tratamiento control.	70
Figura 4.3.b.1 Peso seco de <i>S. virgata</i> y <i>S. punicea</i> en función de los tratamientos, para el final del ensayo.	102
Figura 4.3.b.2 Longitud de los diferentes tejidos de las plantas de <i>S. virgata</i> y <i>S. punicea</i> en función de los tratamientos, para el final del ensayo.	104
Figura 4.3.b.3 Contenido de MP en planta, en función de los tratamientos. Concentración de Cu, Zn, y de Cr.	105
Espectro 4.3.c.1 Espectros EDX. Caracterización de las muestras de suelo prístino correspondientes a un Hapludol típico, mediante TEM.	107
Figura 5.1.a Funcionamiento ecológico del suelo llevado a cabo por la biota que forma parte del mismo, y beneficios otorgados a la sociedad.	118
Figura 5.1.b Diagrama de las fuentes de alimentación de los diferentes grupos tróficos de nematodos de vida libre en el suelo.	123
Figura 5.3.a.1 Producción media de C-CO <sub>2</sub> según los distintos tratamientos.	139
Figura 5.3.a.2 Concentración biodisponible de MP y actividad biológica total del suelo en función de los distintos tratamientos.	141
Figura 5.3.b.1 Abundancia promedio total de Nematodos según los distintos tratamientos de suelo.	143
Figura 5.3.b.2 Biomasa promedio total de <i>S. virgata</i> obtenida para cada tratamiento.	144
Figura 5.3.b.3 Distribución proporcional de los grupos tróficos de Nematodos según los distintos tratamientos de suelo.	145
Figura 5.3.b.4 Distribución proporcional de nematodos en cada tratamiento relativa al tratamiento de suelo sin contaminar.	146
Figura 5.3.c.1 Contenido de Glomalina Fácilmente Extraíble en relación a la contaminación y a la remediación del suelo.	149
Figura 5.3.c.2 Concentración de MP biodisponibles y concentración de Glomalina Fácilmente Extraíble en función de los distintos tratamientos de suelo.	151
Figura 5.3.c.3 Contenido total de Glomalina en relación a la contaminación y a la remediación del suelo.	152
Figura 6.1 Conclusión General a partir de los resultados de los experimentos llevados adelante durante la Tesis.	162
Figura 6.2 Potenciales líneas de investigación.	167

Cuadro 2.2.b.1 Características físico-químicas del suelo Hapludol típico.	21
Cuadro 2.2.b.2 Niveles de MP en el suelo y límites de MP en suelos según diferentes estándares internacionales.	22
Cuadro 2.3.a.1 Efecto del grado de madurez del compost de biosólido sobre semillas de <i>S. punicea</i> y <i>S. virgata</i> .	27
Cuadro 2.3.a.2 Características químicas de los distintos extractos de compost de biosólidos.	28
Cuadro 2.3.a.3 Parámetros de la ecuación de regresión lineal entre la concentración de MP en los extractos y los parámetros medidos en el bioensayo.	28
Cuadro 2.3.b.1 Porcentaje de germinación de semillas de ambas especies de <i>Sesbania</i> en función al período de incubación.	29
Cuadro 2.3.b.2 Índice de Velocidad de Germinación de semillas de <i>S. punicea</i> y <i>S. virgata</i> .	31
Cuadro 2.3.b.3 Porcentaje de longitud radical de ambas especies de <i>Sesbania</i> en función al período de incubación.	32
Cuadro 2.3.b.4 Porcentaje de longitud radical acumulado de <i>S. punicea</i> y <i>S. virgata</i> , en suelo contaminado y enmendado a lo largo del ensayo de incubación.	33
Cuadro 2.3.b.5 Índice de germinación de ambas especies de <i>Sesbania</i> en función al período de incubación.	34
Cuadro 2.3.b.6 Índice de germinación acumulado de <i>S. punicea</i> y <i>S. virgata</i>	35
Cuadro 2.3.c.1 Contenidos de MP disponibles, luego de los ciclos de humedecimiento y secado	36
Cuadro 2.3.c.2 Características químicas de los extractos utilizados en el bioensayo de germinación de <i>S. virgata</i> y <i>S. punicea</i> .	36
Cuadro 2.3.c.3 Análisis de regresión de los metales biodisponibles y de los extractos utilizados en el bioensayo de germinación de <i>S. virgata</i> y <i>S. punicea</i> .	37
Cuadro 2.3.c.4 Análisis de regresión entre los MP biodisponibles y parámetros medidos a las 48 y 168 hs del bioensayo de germinación de <i>S. punicea</i> y <i>S. virgata</i> .	38
Cuadro 3.2.1 Características físico-químicas del suelo Hapludol Típico.	53
Cuadro 3.2.2 Contenido de MP en suelo, y niveles máximos de MP totales.	54
Cuadro 3.3.1 ANOVA y contrastes comparando las concentraciones de MP en tejidos de plantas de <i>S. virgata</i> (suelo).	61
Cuadro 3.3.2 Factor de Translocación y de Bioconcentración en diferentes tejidos de <i>S. virgata</i> (suelo).	62
Cuadro 3.3.3 Concentración media de MP biodisponibles en suelo contaminado y en el tratamiento control.	63
Cuadro 3.3.4 ANOVA y contrastes comparando las concentraciones de MP en tejidos de plantas de <i>S. virgata</i> (hidroponía).	67
Cuadro 3.3.5 Factor de Translocación y de Bioconcentración en diferentes tejidos de <i>S. virgata</i> (hidroponía).	68
Cuadro 4.2.1 Características físico-químicas del suelo Hapludol típico.	88
Cuadro 4.2.a.1 Características físico-químicas del Compost de Biosólido utilizado.	90
Cuadro 4.2.a.2 Contenidos de MP en el suelo y en el compost de biosólido, y el máximo nivel de MP totales permitido en Argentina.	90
Cuadro 4.2.b.1 Procedimiento de extracción secuencial de los MP en las muestras de suelo.	91
Cuadro 4.2.d.1 Diagrama de arreglo factorial de los tratamientos.	94
Cuadro 4.3.a.1 Distribución de Cu, Zn y Cr en las fracciones del suelo Hapludol típico.	95
Cuadro 4.3.a.2 Contrastes: concentración de Cu en la fracción extractable con NaOH, en función a la remediación utilizada.	98
Cuadro 4.3.a.3 Contrastes: concentración de Zn en la fracción extractable con CaCl <sub>2</sub> , en función a la remediación utilizada.	99
Cuadro 4.3.a.4 Contrastes: concentración de Zn en la fracción extractable con EDTA, en	



---

función a la remediación utilizada.	99
Cuadro 4.3.a.5 Contrastes: concentración de Cr en la fracción residual, en función a la remediación utilizada.	100
Cuadro 4.3.a.6 Contrastes: concentración de Cr en la fracción extractable con EDTA, en función a la remediación utilizada.	100
Cuadro 4.3.b.1 ANOVA del arreglo factorial y contrastes entre los tratamientos-Peso y longitud de las especies.	103
Cuadro 4.3.b.2 ANOVA del arreglo factorial y contrastes entre los tratamientos-MP.	106
Cuadro 5.2.e.1 Diagrama de arreglo factorial de los tratamientos.	137
Cuadro 5.2.e.2 Diagrama de arreglo factorial de los tratamientos.	138
Cuadro 5.3.a.1 ANOVA, del arreglo factorial y contrastes entre los tratamientos-liberación de C-CO <sub>2</sub> .	140
Cuadro 5.3.b.1 Índices ecológicos y relaciones entre grupos tróficos de nematodos, calculados para cada uno de los tratamientos.	147
Cuadro 5.3.c.1 ANOVA del arreglo factorial y contrastes entre los tratamientos-glomalina.	150

## ABREVIATURAS

BC:	Nematodos bacteriófagos
BCF:	Factor de bioconcentración
CB:	Compost de biosólido
CR:	Fracción III en extracción secuencial
CE:	Conductividad eléctrica
Cu:	Cobre
Cr:	Cromo
EX:	Fracción I en extracción secuencial
F:	Nematodos fitófagos
FF:	Fertilizante fosfatado
FU:	Fungívoros
GFE:	Glomalina fácilmente extraíble
GT:	Glomalina total
H':	Índice de Shannon de Diversidad Trófica
HERB:	Relación entre fitófagos y fungívoros/bacteriófagos
HMA:	Hongo micorrízico arbuscular
IG:	Índice de Germinación
IT:	Índice de tolerancia
IVG:	Índice de Velocidad de Germinación
J':	Índice de Equidad
$\lambda$ :	Índice de Simpson de Dominancia
MP:	Metal pesado
NCR:	Relación entre bacteriófagos y fungívoros
OC:	Fracción II en extracción secuencial
%G:	Porcentaje de germinación
%LR:	Porcentaje de longitud radical
SC:	Suelo contaminado
SP:	Suelo sin contaminar
Sp:	<i>Sesbania punicea</i>
Sv:	<i>Sesbania virgata</i>
TGM:	Tasa Media de Germinación
TF:	Factor de translocación
RES:	Fracción residual
Zn:	Cinc

## RESUMEN

El suelo, al ser uno de los sistemas clave para el desarrollo de las sociedades, puede resultar contaminado antrópicamente con metales pesados (MP), amenazando su funcionalidad. En función a la creciente preocupación que esto significa, en esta tesis se planteó, de modo general, evaluar el efecto remediador que presentan ciertas enmiendas orgánicas e inorgánicas, así como especies del género *Sesbania* en las propiedades químicas y biológicas de un suelo contaminado con Cu, Zn, y Cr. De todos los ensayos realizados en el transcurso de la misma, se pudo observar que cada MP interaccionó de manera diferente con los componentes del suelo, que además esa interacción con la matriz del suelo se vio influenciada por la presencia simultánea de otros metales. Asimismo, tanto la movilidad, como la disponibilidad de los mismos se vio afectada por la implementación de estrategias de remediación. También, la fitorremediación asistida, que incluye la combinación de estrategias *in situ*, resultó ser una alternativa interesante no solo para inmovilizar los metales en el suelo, sino para obtener sinergias que recuperen la calidad biológica, química y física del suelo. Se concluye que el uso combinado de enmiendas y especies vegetales nativas, es una estrategia práctica aceptable desde el punto de vista económico y ecológico, y que permite la recuperación de la calidad del suelo.

**Palabras clave: suelo, metales pesados, biodisponibilidad, enmiendas químicas, fitoestabilización, *Sesbania*, biota**

## ABSTRACT

The functionality of soil system, may be modify due to the fact that could be anthropically contaminated with heavy metals. Since the increasing concern that this represents, the general aim of this thesis was evaluate the remediation effect that certain organic and inorganic amendments and species of *Sesbania* had in chemical and biological properties of a soil contaminated with Cu , Zn, and Cr . Of all the assay realized in this thesis, it was observed that each heavy metal interacted differently with soil components, further interaction with the soil matrix was influenced by the simultaneous presence of other metals. Also, both the mobility and the availability thereof affected by the implementation of remediation strategies. Moreover, assisted phytoremediation, which includes includes *in situ* combined strategies, proved to be an interesting alternative to immobilize the metals in the soil, and to obtain synergies to recover biological, chemical and physical soil quality. We conclude that the combined use of native plant species and amendments, is an acceptable practice strategy from the economic and ecological point of view, and allows recovery of soil quality.

**Keywords: soil, heavy metals, availability, chemical amendments, phytostabilization, *Sesbania*, biota**

## **Capítulo 1. Introducción General\***

---

\* Parte de este capítulo ha sido publicado

Branzini A. y Zubillaga, M.S. 2013. Phytostabilization as Soil Remediation Strategy. En: Plant-Based Remediation Processes. Ed. Springer, Chapter 10. Soil Biology volume 35: 177-198.

El suelo es la base para el sustento de la vida en los sistemas terrestres, y a su vez es un recurso natural no renovable (Popescu y Stanca 2008). Debido a que el suelo es fuente de alimentos, fibras y madera, constituye uno de los elementos básicos de ambientes rurales y urbanos, contribuyendo directa o indirectamente a la calidad de vida de los humanos (van Kamp et al. 2003; EPA 2008). Además de proveer materia prima, el suelo actúa como un ecotono entre la atmósfera, hidrósfera, biosfera y litósfera, interviniendo en el intercambio de materia, energía y sustancias químicas entre sistemas (Figura 1.1). Por consiguiente, cualquier tipo de impacto que incida sobre él, será susceptible de transmitirse a otros sistemas, repercutiendo en sus funciones a corto o mediano plazo (Martínez Sánchez et al. 2005).

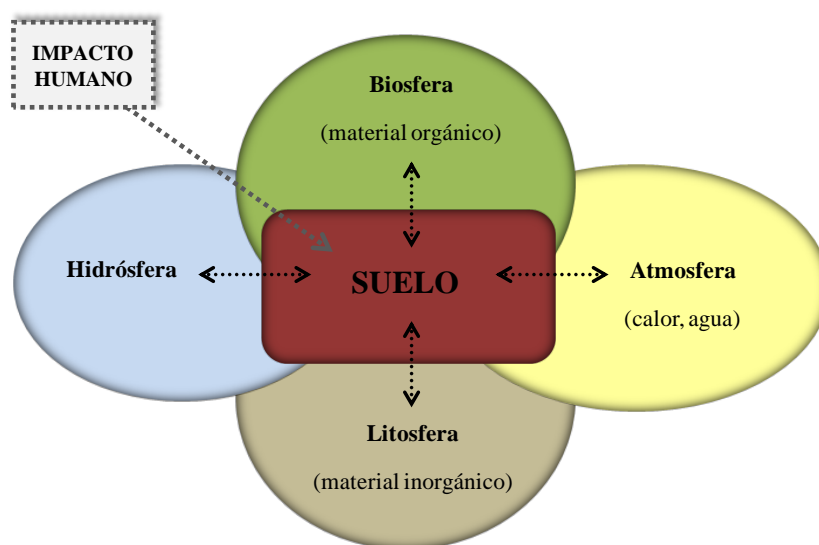


Figura 1.1: El suelo como ecotono entre distintos medios del sistema. Las flechas con ambas puntas representan el intercambio de materia y energía entre los sistemas, y la flecha con una sola punta representa el ingreso de los impactos al suelo

Sumado a los constantes cambios generados por procesos naturales y a la continua evolución del suelo, las actividades antrópicas pueden acelerar los procesos de degradación, modificando rápidamente sus funciones (EPA 2008). En particular, las emisiones producidas por la rápida expansión de áreas industriales, por procesos metalúrgicos, de producción de energía, por aplicación de agroquímicos y por la actividad urbana, fueron y son importantes fuentes, directas e indirectas, de contaminación del suelo (Bolan et al. 2003; Khan et al. 2008).

Entre los contaminantes del suelo se encuentran metales pesados (MP), metaloides y no metales, bajo el nombre colectivo de elementos potencialmente tóxicos (Smith 1996). Dentro de estos contaminantes inorgánicos, los que más comúnmente se encuentran en suelos contaminados son el plomo (Pb), cromo (Cr), arsénico (As), cinc (Zn), cadmio (Cd), cobre (Cu), mercurio (Hg) y níquel (Ni) (McLaughlin et al., 1999). Algunos de estos MP son micronutrientes esenciales para el desarrollo de las funciones vitales de los vegetales y animales (Alloway 1995), y otros no presentan una función biológica o fisiológica conocida. Sin embargo, todos ellos presentan riesgo potencial, ya que cuando exceden los niveles de concentración normales de suelos no contaminados

pueden ingresar a la cadena trófica, generando efectos perjudiciales (Ajmone-Marsan et al. 2008).

Una de las principales características de la contaminación antrópica con MP es que tienden a acumularse en las capas superficiales del suelo, quedando mas móviles y biodisponibles que los metales provenientes de fuentes litogénicas (Kaasalainen y Yli-Halla 2003). Otra importante característica es su prolongado tiempo de residencia en el suelo debido a su baja o nula degradación química o microbiológica, así como a su interacción con la fase sólida del suelo (Bolan et al. 2003; Kirpichtchikova et al. 2006). El mayor riesgo que presentan estas características es que en los primeros centímetros del suelo es donde son máximas sus interacciones con las plantas y los seres humanos (Gleyzes et al. 2001). Sin embargo, cabe destacar que las propiedades físicas, químicas, y biológicas del suelo controlan los ciclos biogeoquímicos, otorgándole la capacidad de amortiguar la contaminación. En la Figura 1.2 se muestran los procesos y factores que determinan la retención de los MP en el suelo, lo que puede reducir la movilidad y disponibilidad de los mismos. Particularmente, la ocurrencia de reacciones de dilución-precipitación, adsorción-desorción, complejación e inclusión en minerales y materia orgánica, determinan su distribución entre la solución y la fase sólida del suelo, encontrándose: 1- en solución, como iones metálicos libres y complejos metálicos solubles, 2- adsorbidos en los sitios de intercambio de los componentes inorgánicos del suelo, como iones intercambiables, 3- ligados a la materia orgánica, formando complejos, 4- precipitados como óxidos, hidróxidos y carbonatos, y 5- residual en las estructuras de los mineral-silicatos (Parkpain et al. 2000; Reichaman 2002; Silviera et al. 2003). No obstante, esta capacidad de retención del suelo no es ilimitada, y por eso la alta acumulación con MP además de sus problemas inherentes, puede causar que el escurrimiento y/o lixiviación incrementen su concentración en aguas superficiales y subterráneas (van Oort et al. 2006).

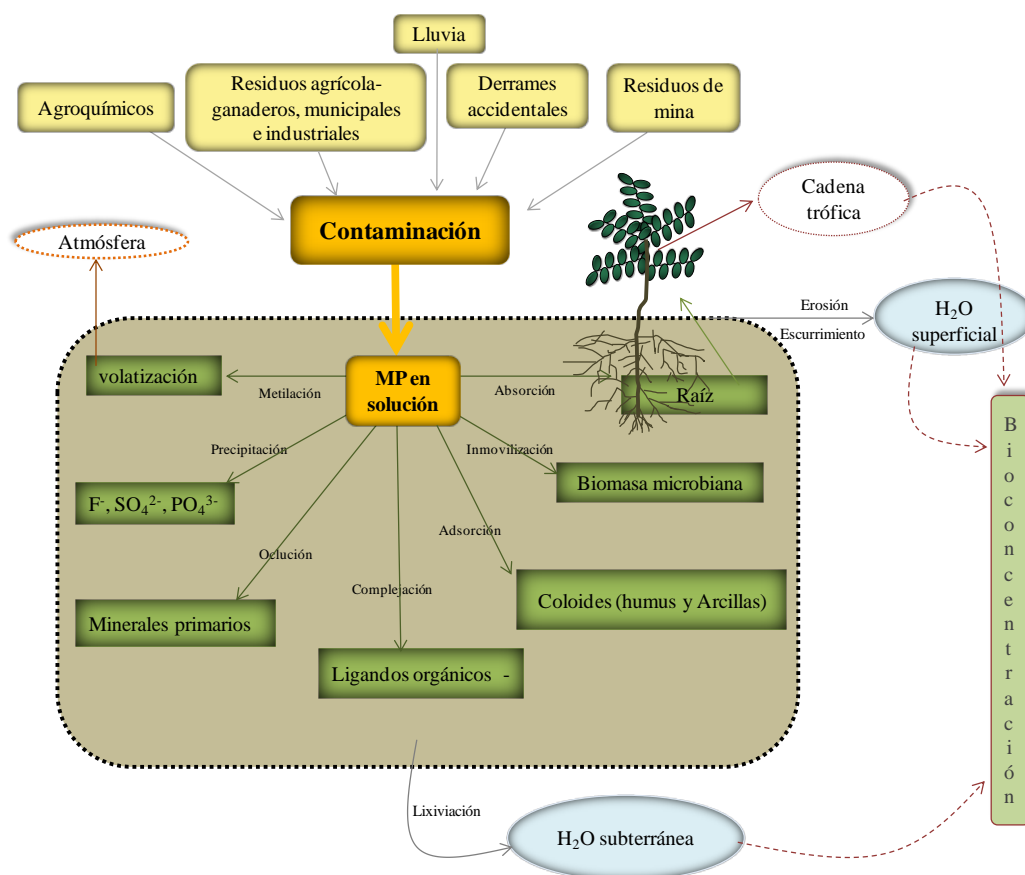


Figura 1.2: Dinámica de los metales pesados (MP) en el suelo, adaptado de Pierzynski et al., 2005.

La contaminación del suelo con estos elementos es de especial preocupación, principalmente por los factores nombrados anteriormente, así como por su fitotoxicidad influenciada por su estado de oxidación o especiación, y por sus características químicas que limitan la aplicación de muchas técnicas de remediación (Alpaslan y Yukselen 2001). La Región pampeana es una zona donde se combina la presencia de grandes urbes con la explotación industrial, agrícola y ganadera (incluida la intensiva), las cuales pueden generar grandes cantidades de residuos (Lavado et al. 1998). Asimismo, la deposición de residuos producidos por la urbanización y la industrialización resulta en la adición al suelo de mezclas de metales pesados que pueden interaccionar entre sí. En particular, el Cu, Zn y Cr son algunos de los contaminantes más habituales que pueden encontrarse en los efluentes liberados por diversas industrias (Flogeac et al. 2007). El Cu y el Zn son micronutrientes esenciales para el crecimiento de los vegetales, y para completar su ciclo vital (Hall 2002). En los suelos del mundo, sus niveles por debajo de los límites permitidos por las regulaciones pueden oscilar entre 1-100 y 3-300 mg kg<sup>-1</sup> respectivamente, y los niveles para considerar contaminados a los suelos dependen del elemento, uso del suelo y la legislación de cada país (Bernal et al. 2007). En general, la contaminación con estos dos MP puede ocurrir en áreas cercanas a industrias metalúrgicas, en zonas periurbanas donde se depositan sedimentos de dragado o donde se concentran y utilizan estiércoles de diferentes orígenes, como por ejemplo para la realización de huertas hortícolas. Por otro lado, el Cr puede encontrarse en el ambiente como Cr<sup>3+</sup> que es el estado iónico estable utilizado principalmente en curtiembres e industrias de acero, y como Cr<sup>6+</sup> que es la forma oxidante y de mayor toxicidad,

utilizado en industrias de cromado, fabricación de pigmentos y colorantes (Patterson 1985; Orozco et al. 2012). Los niveles de Cr total, por debajo de los límites permitidos en los suelos se encuentran alrededor de 1-3000 mg kg<sup>-1</sup> (Bernal et al. 2007).

En general, la exposición humana a la contaminación con MP incluye la ingestión y/o inhalación de partículas de suelo con MP, el consumo de alimentos contaminados (cadena trófica: suelo-planta-humanos o suelo-planta-animal-humano), así como el consumo de agua de bebida contaminada (Madrid et al. 2006; Navarro-Aviñó 2007; Ling et al. 2007). Debido a esta toxicidad potencial directa y/o indirecta sobre la salud humana, los MP pueden ser una amenaza para la salud (Ling et al. 2007). Entre los principales efectos del Cu, Zn y del Cr, se pueden nombrar afecciones en el tracto respiratorio (Cu), deterioro en la respuesta inmune (Cu y Zn) (Menéndez et al. 2005), cardiopatías (Cr), y efectos carcinógenos.

Debido a que la tasa de formación y regeneración del suelo es más lenta que la de su degradación y teniendo en cuenta que el suelo es la principal fuente de contaminantes para la cadena trófica (Kabata-Pendias 2004), la remediación de suelos contaminados podría considerarse un requisito legal y un compromiso social con posibilidades de reutilización del sitio, oportunidades de investigación científica y demandas tecnológicas (Accioly y Siqueira 2000). De esta manera, se lograría cuidar la salud humana, se evitaría la dispersión de la contaminación, y se podría encontrar el funcionamiento equilibrado de los ecosistemas en áreas contaminadas (Suthersan 1996).

Como se indicó anteriormente, el suelo tiene la capacidad de inactivar los efectos negativos de los contaminantes, mediante la atenuación natural, que incluye mecanismos de neutralización, degradación biótica o abiótica, adsorción, complejación, e insolubilización, dependientes fundamentalmente de determinadas características de los horizontes superficiales del suelo (Díez et al. 2002). Sin embargo, la utilización de estrategias de remediación de suelos contaminados con MP podría complementar los procesos de atenuación natural que tienen lugar en el suelo, aumentando su calidad. Particularmente, el uso de variadas tecnologías químicas y/o biológicas, como la aplicación de enmiendas orgánicas e inorgánicas, o la utilización de vegetales, puede lograr la estabilización de los MP, minimizando de esta manera su biodisponibilidad (Knox et al. 2000; Mench et al. 2006). Ambas estrategias de remediación son de particular interés ya que son originales, su relación costo-efectividad es baja comparada con las técnicas físico-químicas convencionales; y principalmente son útiles en esta estabilización de MP (Yang et al. 2001; Shukla et al. 2009).

La aplicación de enmiendas inorgánicas u orgánicas pueden reducir la movilidad y biodisponibilidad de MP (Adriano et al. 2003; Clemente et al. 2006). Las enmiendas contribuyen a su retención a través de la precipitación en el caso de las enmiendas inorgánicas (por ejemplo fertilizantes fosfatados), o mediante la formación de complejos estables en el caso de las orgánicas (compost, entre otros). Al mismo tiempo, la aplicación conjunta de estas enmiendas podría facilitar el establecimiento de plantas y la actividad de la microfauna del suelo degradado (Madejón et al. 2006). En ese contexto, la fitorremediación es una técnica basada en utilizar plantas para remediar suelos contaminados a través de la absorción de MP (Golan-Goldhirsh et al. 2004). Esta tecnología podría ser beneficiosa desde el punto de vista económico así como ecológico, por lo cual es una forma de descontaminación aceptada por la sociedad y los organismos regulatorios internacionales (Pulford et al. 2002). Además, presenta una ventaja adicional por efecto de cobertura del suelo, que reduce la erosión eólica e hídrica, evitando paralelamente la degradación del suelo no cubierto por plantas (Vangronsveld et al. 1991; 1993).



Las plantas remediadoras responden a la disponibilidad de metales en los suelos mediante diferentes estrategias. La estrategia de “exclusión”, mantiene constante la concentración de metales en los tejidos dentro de una amplia gama del contenido en el suelo; en la estrategia de “indicación”, la absorción y transporte de metales a la parte aérea de la planta incrementa con el contenido del suelo; y la estrategia de “acumulación”, o incluso hiperacumulación, consiste en la fácil acumulación de metales en partes aéreas, independientemente de la concentración en el suelo (Baker 1981). La función común que tienen estas estrategias de tolerancia, es asegurar la supervivencia y la capacidad de reproducirse bajo elevadas concentraciones de MP (Macnair 1993; Hall 2002).

Las estrategias antes nombradas definen el grupo de fitorremediación mediante el cual las plantas pueden contribuir a la recuperación de sitios contaminados con MP: fitoextracción, rizofiltración (aguas contaminadas), fitovolatilización y fitoestabilización (Figura 1.3). Este último grupo considera la utilización de plantas tolerantes para reducir la movilidad y disponibilidad de MP, previniendo su migración (Vangronsveld et al. 1995; Pulford y Watson 2003). Asimismo, estas plantas cumplen con ciertos atributos, como por ejemplo, presentar rápido crecimiento y elevada producción de biomasa (Garbisu y Alkorta 2001). Sumado a estos atributos y a que uno de los criterios a tener en cuenta es la protección y conservación del ecosistema, es de especial interés utilizar como remediadoras, plantas autóctonas de la Región Pampeana (Godinez-Álvarez 1999). De esta manera, las plantas tolerantes y de rápido crecimiento, adaptadas al clima de la Región Pampeana, podrán estar en ventaja competitiva frente a las especies exóticas, que muchas veces son utilizadas para hiperacumular muy altas cantidades de un MP específicamente pero presentan lento crecimiento, reducida biomasa y sistema radical superficial (Cunningham et al. 1995; Pulford y Watson 2003). Asimismo, estas últimas podrían convertirse en invasivas, modificando la estabilidad y eficiencia del ecosistema (Lasat 2002).

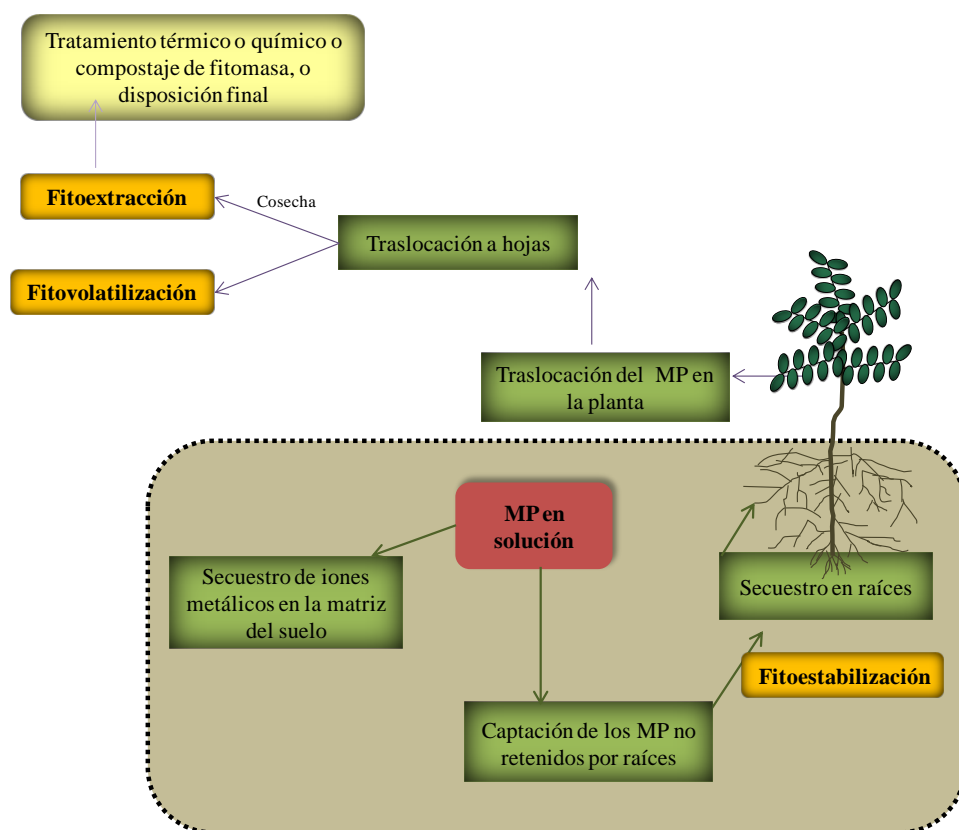


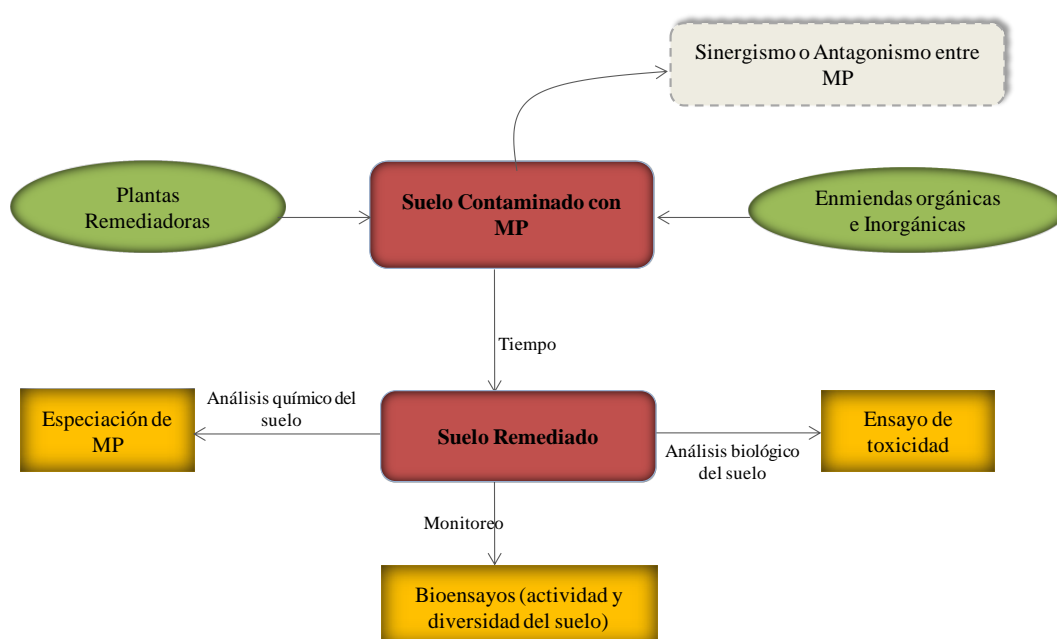
Figura 1.3: Esquema general de la descontaminación del suelo contaminado con MP en un proceso natural de fitorremediación, adaptado de Singh et al., 2003.

La mayor información disponible acerca de la tolerancia a MP y fitoestabilización se basa en especies herbáceas. En la Región Pampeana se ha utilizado satisfactoriamente *Festuca rubra* para reducir la movilidad de Zn, Cd y Cu hacia horizontes subsuperficiales (Zubillaga et al. 2011). Unos pocos estudios a nivel mundial investigaron la tolerancia en especies leñosas para la recuperación de sitios multicontaminados (Punshon y Dickinson 1997), y a nivel local se conoce la utilización de *Discaria americana*, un arbusto xerófilo ampliamente distribuido desde el norte de la Patagonia hasta sur-este de Brasil, para fitorremediar un solo metal (Zn) (Tortosa 1983; Cusato et al. 2007). Sin embargo, no se conocen estudios a nivel local que utilicen arbustos nativos de la Región Pampeana para remediar suelos multicontaminados. Dentro del grupo de plantas leñosas, se encuentran especies del género *Sesbania* pertenecientes a la familia *Leguminosae*. En la Región Pampeana se registran dos especies autóctonas de *Sesbania*, *Sesbania virgata* (Cav.) Poir. (Rama Negra) y *Sesbania punicea* (Acacia Mansa), ambas pertenecientes al subgénero *Daubentonia* (Cabrera 1994). Además de ser plantas autóctonas de la región, estas especies de *Sesbania* presentan rápido crecimiento y elevada biomasa como para ser utilizadas en estudios de estabilización. Un ejemplo de fitorremediación con plantas de *Sesbania*, es el realizado en USA por Sahi et al. (2007) quienes encontraron que las mismas pueden crecer sin mostrar síntomas de toxicidad a concentraciones menores e iguales de 300 ppm de Cu. Otro estudio realizado en China, indica que para la re-vegetación de sitios contaminados con Zn, Pb y Cd provenientes de yacimientos mineros, se utilizan especies anuales y autóctonas de *Sesbania*. En ese estudio se demostró que estas especies presentan una cierta tolerancia a la toxicidad causada por estos MP (Ye et al.

2001). En tanto, en nuestro país aún no se estudió que especies de este género tienen utilidad como fitoestabilizadoras.

*El objetivo general de la presente tesis fue evaluar el efecto remediador que presentan ciertas enmiendas orgánicas e inorgánicas, así como especies del género Sesbania en las propiedades químicas y biológicas de un suelo contaminado con Cu, Zn, y Cr.*

### Esquema resumen de Tesis



*El presente trabajo de Tesis intenta comprender el funcionamiento de un suelo contaminado como un sistema vivo y dinámico y pasible de ser remediado a partir de los aportes individuales desarrollados en cada uno de sus capítulos. Primero, tratando de entender el comportamiento químico (interacciones, distribución, movilidad, especiación y toxicidad de MP), y segundo tratando de entender el funcionamiento biológico (actividad, abundancia y diversidad) del suelo antes y después de aplicar técnicas de remediación.*

## **Parte A: Estudios sobre *Sesbania sp.***

### **Capítulo 2. Variación de la fitotoxicidad del suelo contaminado con metales pesados mediante el agregado de enmiendas. Estudio preliminar de especies tolerantes<sup>□</sup>**

---

<sup>□</sup> Este capítulo ha sido publicado

Branzini, A. y Zubillaga, M.S.. 2010. Assessing Phytotoxicity of Heavy Metals in Remediated Soil. *International Journal of Phytoremediation*, 12: 335-342. ISBN 1549-7879 (online) /1522-6514 (paper). DOI: 10.1080/15226510902968126.

## 2.1. INTRODUCCION

La toxicidad de los MP incorporados al suelo por actividades antrópicas podría minimizarse, entre otras formas, mediante el uso de enmiendas orgánicas e inorgánicas, las cuales logran su inmovilización o la reducción de su biodisponibilidad (Adriano 2001; Basta et al. 2001).

Las enmiendas orgánicas, incluyen diferentes tipos de compost los cuales contienen gran proporción de materia orgánica humificada (ácidos fúlvicos, ácidos húmicos y huminas). La materia orgánica con dicha calidad puede adsorber MP en forma relativamente rápida, a través de la formación de quelatos, o a largo plazo mediante la formación de complejos estables (Adriano 2001; Castaldi y Melis 2004; Basta et al. 2005). Uno de los beneficios de usar compost de residuos como enmienda, se basa en la valorización ambiental de los mismos, ya que mediante el proceso controlado de compostaje (proceso biooxidativo) estos se descomponen, generando CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, energía calórica y materia orgánica estabilizada (Zubillaga y Lavado 2002; Tognetti et al. 2005; Zubillaga y Lavado 2006). Durante este proceso se suceden tres etapas, asociadas a la temperatura y a la actividad microbiana: la mesófila, la termófila, y por último la de maduración (Zucconi y de Bertoldi 1987; Laos et al. 2002). En la etapa mesófila, la temperatura varía entre 20 y 35 °C y se encuentran bacterias y hongos mesófilos. En la termófila, la temperatura oscila entre los 40 y 70 °C; en la cual se encuentran bacterias y hongos termófilos, y actinomicetes. En la etapa de maduración la temperatura de la masa es la del ambiente y encontramos insectos, nematodos, moluscos y bacterias y hongos mesófilos. Es importante aclarar, que al momento de aplicar el compost al suelo, el mismo debe poseer un adecuado grado de madurez; de lo contrario, la deficiente degradación de la materia orgánica podría provocar efectos negativos en el desarrollo de las plantas, por la presencia de metabolitos intermedios fitotóxicos (Zucconi et al. 1985; Zubillaga y Lavado 2003). Otro de los beneficios del uso de las enmiendas orgánicas, además del efecto inmovilizador, es que permite el reciclado de la materia y de los nutrientes, así como el mejoramiento las propiedades físicas del suelo (Sanchez-Monedero et al. 2004).

El uso de enmiendas inorgánicas en suelos contaminados, como los fertilizantes fosfatados solubles, pueden, también, remediar el suelo a través de procesos directos de adsorción en la superficie de los fosfatos y/o la formación de precipitados metal-fosfato estables (Vangronsveld y Cunningham 1998; Adriano et al. 2004). Actúan además como fertilizantes, proveyendo nutrientes a las plantas (Sharpley et al. 1999).

La toxicidad y biodisponibilidad de los MP en el suelo son dos factores claves a determinar en los estudios de remediación. En general, los métodos utilizados para predecir los peligros de los contaminantes metálicos en suelo incluyen a los análisis químicos, ya que determinan su solubilidad, disponibilidad y estado de oxidación (Ali et al. 2004). Sin embargo, ninguno de ellos considera las complejas interacciones entre la matriz del suelo, los metales y la biota (Leitgib et al. 2007). Por eso, para una mayor comprensión de los efectos en el ecosistema, deben contemplarse los análisis químicos, los biológicos y los toxicológicos (Juvonen 2000; Gruiz 2005). Por ejemplo, la utilización del test de fitotoxicidad permite estimar indirectamente la disponibilidad de los MP en extractos con suelo, mediante la determinación de parámetros morfológicos de las plantas. Uno de los test fitotoxicológicos mas utilizado es el bioensayos de germinación propuesto por Zucconi et al. (1981) (Robidoux et al. 2005; Zubillaga y Lavado 2006).

En general, los bioensayos de germinación fueron desarrollados para evaluar la madurez de los compost utilizados como enmiendas, o para evaluar el efecto generado por los contaminantes en la biota del suelo (Warman 1999; Gruiz 2005; Zubillaga y Lavado 2006). Además, si bien existen trabajos que evalúan la utilización de compost en el mejoramiento de la salud del suelo (Pardo et al. 2011; Pardo et al. 2014), no se conocen trabajos que utilicen este bioensayo para estimar el grado de inmovilización de MP en suelos frente a la aplicación de enmiendas orgánicas e inorgánicas. Es importante destacar que durante el estado inicial de la germinación, existen variados procesos en los cuales la presencia de MP puede tener impacto directo sobre la viabilidad de la semilla y el potencial desarrollo de las plantas (Sobrero y Ronco 2004). En tal sentido, al considerar este estado como una etapa crítica en el ciclo de vida de las plantas, resulta clave determinar la performance de las mismas luego de la aplicación de enmiendas como estrategia de remediación (Veasey et al. 1999).

Debido a que el ecosistema pampeano no está aislado de los procesos de contaminación por intervención humana, y que consecuentemente sufre transformaciones y alteraciones de su biodiversidad, es importante conocer el comportamiento que las especies vegetales tienen dentro de esta región (Ricklefs 1997; Brown et al. 2006; Martín-López et al. 2007). Una manera de contribuir a la conservación de los recursos fitogenéticos nativos podría ser ampliar los conocimientos acerca de la tolerancia que especies arbustivas presentan frente a altas concentraciones de MP (Marinucci et al. 2004; Carpena y Bernal 2007). Asimismo, es importante la comparación entre distintas especies del mismo taxón, ya que es usual que existan diferencias de sensibilidad entre especies emparentadas (Sverdrup et al. 2003).

Como se mencionó en la Introducción General, dentro del grupo de plantas tolerantes a MP y nativas de la Región Pampeana, se encuentran especies del género *Sesbania* las cuales integran la familia Leguminosae, sub-familia Papilionoideae. La mayoría de las especies pertenecientes a este género son anuales o bianuales, algunas son arbustos perennes de corta duración y unas pocas son realmente perennes (Ndoye et al. 1990). En la Región centro-este de la Argentina se encuentran las especies *Sesbania virgata* y *Sesbania punicea*. Ambos arbustos con follaje caedizo tardío (perenne), pertenecen al subgénero *Daubentonia* (Soriano et al. 1991; Cabrera 1994; Simoes et al. 2008; Faggi et al. 2009). Las principales bondades de estas especies para su utilización como fitorremediadoras son, su rápido crecimiento inicial (especies pioneras), su tolerancia a condiciones de anoxia y su capacidad de tolerar la toxicidad causada por MP (Kolb et al. 2002; Chan et al. 2003). Por ejemplo, Wong et al. (1992) manifestaron que distintas especies de *Sesbania* presentan alta tolerancia y supervivencia en áreas áridas, infértiles y contaminadas con MP. Estudios posteriores al de estos autores, encontraron que *Sesbania rostrata* (Yang et al. 1997) y *Sesbania cannabina* (Ye et al. 2001) son aptas para crecer y completar su ciclo de vida en suelos derivados de actividad minera. Asimismo, un estudio más reciente indicó que *Sesbania drummondii* crece en sistemas con concentraciones de cobre del orden de  $300 \text{ mg kg}^{-1}$ , sin exhibir síntomas de toxicidad (Sahi et al. 2007). Si bien numerosos estudios indicaron la tolerancia de distintas especies de *Sesbania* a altas concentraciones de MP, todavía no se ha investigado la capacidad remediadora específica de *Sesbania virgata* y *Sesbania punicea*.

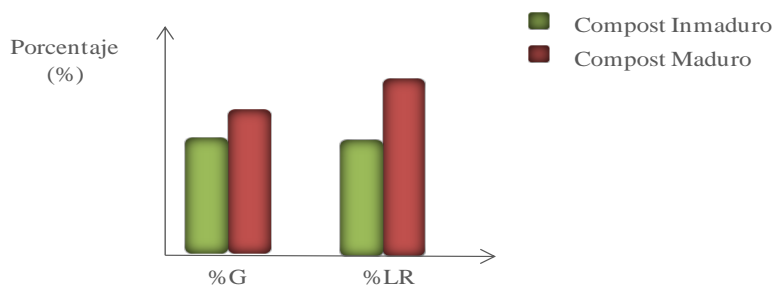
Consecuentemente, el estudio de la respuesta que presentan ambas especies autóctonas, frente a eventuales procesos de contaminación con MP, así como el comportamiento diferencial de tolerancia entre estas especies, podría acercarnos a plantear estrategias adecuadas de remediación.

## Objetivos

1. Determinar la variación de la estabilidad del compost de biosólidos a lo largo del proceso de compostaje, y su influencia en la germinación y crecimiento radical de las especies nativas de la Región Pampeana, *Sesbania virgata* y *Sesbania punicea*.
2. Evaluar los cambios en la biodisponibilidad de Cu, Zn y Cr de un suelo contaminado, frente a la aplicación de enmiendas orgánicas e inorgánicas, utilizando como indicador un bioensayo de fitotoxicidad con *Sesbania virgata* y *Sesbania punicea*.

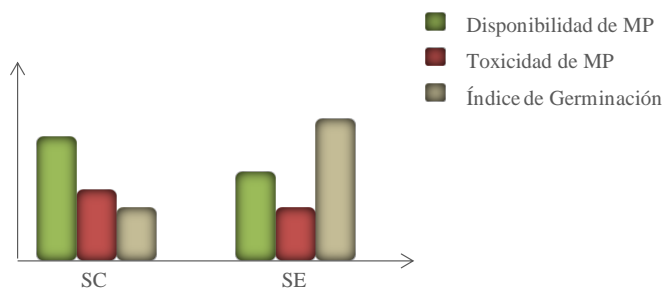
## Hipótesis

1. Las etapas tempranas del desarrollo de las dos especies de *Sesbania* estudiadas serán afectadas negativamente por la presencia de eventuales componentes fitotóxicos en el compost inmaduro, en comparación con compost maduros.



Esquema 2.1.1: Porcentaje de Germinación (%G) y porcentaje de Longitud Radical (%LR) para las especies vegetales, según se desarrollen en un medio con compost maduro o inmaduro.

2. La disminución de la disponibilidad de MP por aplicación de enmiendas modificará su toxicidad para las especies vegetales, y esto se evidenciará en un incremento de su germinación.



Esquema 2.1.2: Efecto de la aplicación de enmiendas sobre la disponibilidad y la toxicidad de MP, y sobre el índice de Germinación de las especies vegetales. SC: suelo contaminado con MP, SE: suelo enmendado.

## 2.2. MATERIALES Y METODOS

### 2.2.a. Producción y testeo de la fitotoxicidad del compost de biosólido

Para la producción del compost, se utilizó biosólido proveniente del operador de aguas de la Ciudad de Buenos Aires, el cual fue mezclado con aserrín, en una proporción volumétrica de 1:1 (biosólido: aserrín). El compostaje se realizó en una pila estática al aire libre, con volteos semanales, humedecida periódicamente, y cubierta con nylon oscuro para evitar pérdidas de humedad. Se tomaron registros térmicos e hídricos diarios.

De la masa a compostar, se extrajeron muestras en tres momentos del proceso de compostaje: 1- durante la etapa mesófila, (CBI); 2- al final de la etapa termófila (CBII); y 3- al finalizar la maduración del compost (CBIII). Las muestras fueron secadas a 60°C, y pasado por un tamiz de 2 mm (Imagen 2.2.a1).



Imagen 2.2.a.1: (a) Pila de compost de biosólidos, y registro diario de temperatura; (b) Compost de biosólido maduro, pasado por tamiz de 2 mm (b).

A fin de establecer el grado de influencia de la madurez del compost sobre la germinación de *Sesbania*, se utilizó bioensayo de fitotoxicidad sugerida por Zucconi et al. (1981) con pequeñas modificaciones. Se prepararon extractos acuosos mezclando 7 g de cada muestra de compost enunciada anteriormente (seca y tamizada) con 70 ml de agua destilada en una relación de 1:10; se agitó durante 24 hs y mantuvo 30 minutos a 60°C, filtrándose posteriormente. En cajas de Petri de 8 cm de diámetro se colocó papel de filtro Whatman N° 3, impregnado con 6 ml de cada extracto y se ubicaron 20 semillas escarificadas mecánicamente de *S. virgata* y *S. punicea*, en tratamientos independientes. Las cajas fueron incubadas en estufa de incubación, a oscuridad y a 26°C durante 168 horas. Como blanco se utilizó agua destilada, y cada tratamiento se realizó por triplicado. Las semillas fueron observadas a las 48, 72, 96 y 168 hs de comenzada la incubación, contabilizando el número de semillas germinadas, considerando germinación cuando la longitud de la raíz primaria alcanzó una longitud igual o superior a 5 mm (USEPA 1995).

Con los parámetros medidos, se calcularon el porcentaje de germinación (% G), el porcentaje de longitud radical (%LR), y el índice de germinación (IG) (Zucconi et al. 1981; Tiquia 2000).



$$\% \text{ G} = \frac{(\text{G tratamiento})}{(\text{G control})} \times 100$$

Donde (G tratamiento) es el número de semillas germinadas en las cajas con extracto de compost con enmienda, y (G control) es el número de semillas germinadas en el tratamiento control.

$$\% \text{ LR} = \frac{(\text{LR tratamiento})}{(\text{LR control})} \times 100$$

Donde (LR tratamiento) es la media de longitud radical en las cajas con extracto de compost, y (LR control) es la media de longitud radical en el tratamiento control.

$$\text{IG (\%)} = (\text{G} \times \text{LR}) \times 100$$

## 2.2. b. Bioensayo de fitotoxicidad de suelo

El suelo seleccionado para realizar el experimento fue un Hapludol típico, representativo de la Pampa Arenosa (35°37' S, 61°22' O) (Cuadro 2.2.b.1). Cuatro muestras compuestas de los primeros 20 cm de profundidad fueron recolectadas al azar (10 muestras individuales) de un área homogénea de 4 ha. El suelo fue secado a temperatura ambiente y tamizado a fin de obtener tamaños de partícula y agregados menores de 2 mm de diámetro.

Cuadro 2.2.b.1: Características físico-químicas del suelo Hapludol típico. Todos los datos están expresados en base seca (PS).

Arcilla	Limo	Arena	Textura	CIC	pH	CE	MO <sub>total</sub>	C <sub>orgánico</sub>	N <sub>total</sub>
(%)				(cmol <sup>c</sup> kg <sup>-1</sup> )	(1:2.5, H <sub>2</sub> O)	(dS m <sup>-1</sup> )	(%)		(g kg soil <sup>-1</sup> )
20.2	21.6	58.2	Franco-Arenosa	22.3± 0.06	5.61±0.11	0.61± 0.01	1.98±0.03	1.55±0.61	2.8±0.02

*Nota:* CIC= capacidad de intercambio catiónico; CE= conductividad eléctrica; MO<sub>total</sub>= materia orgánica total; C<sub>soluble</sub>= carbono soluble; N<sub>total</sub>= nitrógeno total.

Los contenidos de MP de las muestras originales fueron incrementados agregando soluciones de metales (CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y H<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>), logrando concentraciones finales de, Cu: 450 mg kg<sup>-1</sup>, Zn: 630 mg kg<sup>-1</sup>, y Cr: 550 mg kg<sup>-1</sup>, superando los valores de concentración máxima permitida para suelos agrícolas según diferentes estándares (Cuadro 2.2.b.2). A fin de lograr el equilibrio con la fracción coloidal del suelo, se realizaron ciclos de humedecimiento y secado cada cinco días, durante un período de 3 meses.

Cuadro 2.2.b.2: Niveles de MP en el suelo y Límites de metales pesados en suelos según diferentes estándares internacionales (mg kg<sup>-1</sup> masa seca)

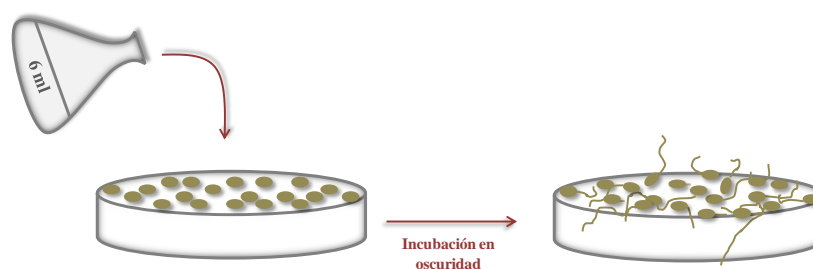
Metales pesados	Niveles de MP	MNP <sup>1</sup>	UK <sup>2</sup>	Nueva Zelanda <sup>3</sup>	Francia <sup>4</sup>
			mg kg <sup>-1</sup>		
<b>Cu</b>	450	50	80-200	60	100
<b>Zn</b>	630	200	200-300	300	300
<b>Cr</b>	550	400	400	150	150

1- MNP - Máximo Nivel Permitido (USEPA Standards); 2- Obbard y Jones, 2001; 3- BIO-GRO Standards, 2001; 4- Planquart et al., 1999

Los tratamientos consistieron en utilizar dos tipos de enmiendas. Como enmienda orgánica se utilizó compost de biosólido (CBII), el cual fue seleccionado teniendo en cuenta los resultados del bioensayo de la sección anterior; y como enmienda inorgánica, se utilizó fertilizante fosfatado (FF) (superfosfato triple). Las dosis utilizadas fueron equivalentes a 100 Mg ha<sup>-1</sup> y 100 kg ha<sup>-1</sup> respectivamente. Ambas enmiendas se dejaron estabilizar con el suelo enriquecido con MP durante 100 días. Los tratamientos resultantes fueron:

- i) H<sub>2</sub>O destilada utilizado como control
- ii) suelo contaminado con MP (SC)
- iii) SC + CBII
- iv) SC + FF
- v) SC + CBII + FF

El procedimiento para realizar el bioensayo de fitotoxicidad, fue el mismo que al utilizado en la sección 2.2.a. Se utilizó la metodología sugerida por Zucconi et al. (1981) con pequeñas modificaciones, preparando extractos acuosos de los distintos tratamientos de suelo enunciados anteriormente (seco y molido) con las mismas proporciones de muestra de suelo y agua destilada (1:10) (Esquema 2.2.b.1).



Esquema 2.2.b.1: Representación del bioensayo de germinación de semillas de *Sesbania punicea* y *Sesbania virgata*, y sus resultados luego del período de incubación.

Las semillas fueron observadas cada día y se cuantificó la germinación y la longitud de raíces de las especies (Imagen 2.2.b.1). Para ello, se contabilizó el número de semillas germinadas (longitud de raíz primaria igual o superior a 5 mm) (USEPA 1995). Debido a retrasos en el momento de germinación, los parámetros vegetales se midieron luego de 48, 72, 96 y 168 h de incubación, para lo cual, las medidas fueron sucesivas, sin disturbar las semillas germinadas en cada una de las cajas de Petri.

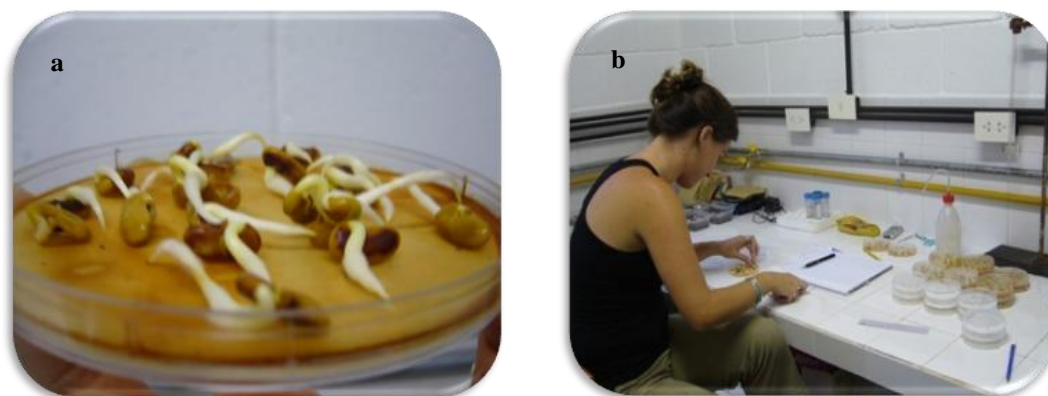


Imagen 2.2.b.1: (a) Semillas de *Sesbania virgata*, germinadas luego de 48 hs de incubación; y (b) Cuantificación de semillas germinadas y de la longitud de raíces luego del período completo de incubación.

Utilizando las mismas formulas que en la Sección 2.2.a, se calcularon el porcentaje de germinación (%G), el porcentaje de longitud radical (%LR), y el índice de germinación (IG) (Zucconi et al. 1981).

También se calculó la Tasa Media de Germinación (TGM) (García Huidobro et al. 1982):

$$\text{TGM} = \frac{((G_1 \cdot D_1) + (G_2 \cdot D_2) + \dots + (G_n \cdot D_n))}{GT_n}$$

Donde  $G_1, G_2, \dots, G_n$  representan el número de semillas germinadas en i-ésimo día;  $D_1, D_2, \dots, D_n$  representan el número de días desde el inicio del bioensayo de germinación, y  $GT_n$  es el número total de semillas germinadas en el día n cuando se realizó el conteo final de semillas.

Se calculó, además, Índice de Velocidad de Germinación citado por Maguire (1962), el cual se expresa como el número de semillas germinadas por día:

$$\text{IVG} = \frac{G_1}{D_1} + \frac{G_2}{D_2} + \dots + \frac{G_n}{D_n}$$

Donde  $G_i$  y  $D_i$  tienen el mismo significado que en la fórmula anterior.

Previo a retirar las plántulas de las cápsulas de Petri se realizó una observación detallada del estado general de las mismas para detectar cualquier indicador de fitotoxicidad o de crecimiento anormal (ápices radiculares con necrosis, pelos absorbentes poco desarrollados, necrosis en los cotiledones).

### **2.2. c. Análisis químicos**

Los MP biodisponibles, presentes en muestras de suelo fueron extraídos con  $\text{CaCl}_2$  0.01M, utilizándose una relación solución  $\text{CaCl}_2$ : suelo de 10:1, a una temperatura de 20°C. Los extractos fueron agitados durante 2 horas, centrifugados a 2000 rpm durante 10 minutos y filtrados, para luego cuantificar la concentración de MP mediante espectrofotometría de absorción atómica (AAS) en un equipo Perkin Elmer AAnalyst 300 (Houba et al., 1990). En los extractos acuosos, el pH y conductividad eléctrica (CE) se determinaron mediante equipo Mettler Delta 320 (Faithfull 2004). Los contenidos totales de Cu, Zn y Cr de los diferentes extractos fueron analizados mediante espectrofotometría de absorción atómica en un equipo Perkin Elmer AAnalyst 300 (Cooksey y Barnett 1979).

### **2.2.d. Análisis estadístico**

Los resultados fueron sometidos a un análisis factorial de 2x3 (niveles de especies vegetales y niveles de compost) para el bioensayo 2.2.a, y a uno de 2x4 (niveles de especies vegetales y niveles de enmiendas) para el bioensayo 2.2.b, analizándolos mediante un ANOVA. Las diferencias significativas entre medias se establecieron mediante el test de LSD ( $p < 0,05$ ); previamente verificados los supuestos del modelo (las varianzas fueron estabilizadas cuando fue necesario mediante transformación logarítmica de los datos). También se realizaron análisis de correlaciones lineales simples entre las variables analizadas.

## **2.3. RESULTADOS**

### **2.3.a. Toxicidad de compost de biosólido, en muestras de diferente grado de madurez**

Los resultados obtenidos en el bioensayo de germinación con diferentes grados de madurez del compost de biosólido, se presentan en el Cuadro 2.3.a.1. Al igual que en *S. punicea*, en *S. virgata* se observó que el porcentaje de germinación (%G) difirió significativamente en función de los diferentes grados de madurez del compost ( $p < 0,001$ ), y en particular, el tratamiento CBII fue el que mayor porcentaje tuvo con respecto a los tratamientos CBI y CBIII (Imagen 2.3.a.1). Asimismo, en el Cuadro 2.3.a.1 puede observarse que los porcentajes de longitud radical (%LR) siguieron el mismo patrón observado en el %G, siendo significativamente mayor para el tratamiento CBII ( $p = 0,0113$ ). En cuanto al índice de germinación (IG), el tratamiento CBII presentó mayor IG que los tratamientos CBI y CBIII. Cabe destacar, que no existieron marcadas diferencias entre los diámetros de las raíces de cada uno de los tratamientos.

Cuadro 2.3.a.1: Efecto del grado de madurez del compost de biosólido sobre el porcentaje de germinación (%G), la longitud de raíces (%LR) y el índice de germinación (IG) de semillas de *S. punicea* y *S. virgata*.

Tratamiento			
<i>S. punicea</i>	%G	%LR	IG
CBI	22,95 b	82,44 abc	0,35 ab
CBII	83,73 a	139,33 ab	0,64 a
CBIII	22,95 b	90,95 abc	0,26 ab
<i>S. virgata</i>			
CBI	21,94 b	77,27 bc	0,36 ab
CBII	94,22 a	144,64 a	0,65 a
CBIII	19,17 b	60,29 c	0,23 b

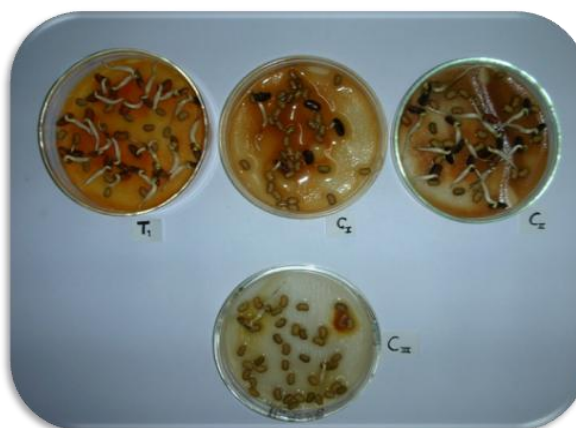


Imagen 2.3.a.1: Germinación de semillas de *Sesbania virgata* para los diferentes tratamientos, luego del período de incubación.

En el Cuadro 2.3.a.2 se indican los valores de pH, CE, Nt y las concentraciones de Cu, Cr y Zn en cada uno de los extractos. Tanto el pH y la CE, como el Nt difirieron significativamente entre tratamientos ( $p < 0,001$  y  $p < 0,001$ , respectivamente). En particular, se observó que el tratamiento CBII presentó el valor más bajo de CE, lo cual podría relacionarse con el mayor %G observado en la Figura 2.3.a.1. Sin embargo, no se hallaron correlaciones entre estas variables y los porcentajes e índice calculados.

Cuadro 2.3.a.2: Características químicas de los distintos extractos de compost de biosólidos. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos. (CE:  $\text{dsm}^{-1}$ , concentraciones de N:  $\text{mg N ml}^{-1}$  muestra, y de MP:  $\text{mg l}^{-1}$ ).

Tratamiento	pH	CE	Cu	Zn	Cr	Nt
<b>Control</b>	6,010 c	0,013 d	ND	ND	ND	-
<b>CBI</b>	7,840 a	3,590 a	0,236	0,243	0,002	0,137
<b>CBII</b>	7,480 ab	1,620 c	0,136	3,781	0,078	0,096
<b>CBIII</b>	7,330 c	2,350 b	0,29	0,266	0,007	0,078

Asimismo, todos los estados de madurez del compost utilizado en el bioensayo de germinación, presentaron bajos niveles de MP, sin mostrar diferencias significativas entre ellos, salvo para el Zn y Cr en el CBII con respecto a los otros tratamientos (Cuadro 2.3.a.2). En las dos especies estudiadas, se encontró que el %G estuvo ligeramente relacionado de manera inversa con la concentración total de Cu presente en los extractos. Contrariamente, cuando la concentración de Zn y Cr en los extractos fue mayor, ambas especies de *Sesbania* presentaron un mayor %G (Cuadro 2.3.a.3).

Cuadro 2.3.a.3: Parámetros de la ecuación de regresión lineal entre la concentración de MP en los extractos y los parámetros medidos en el bioensayo. El Nivel de significancia es con un  $p < 0,05$ .

Ecuación de regresión	R <sup>2</sup>	Nivel de significancia
$\%G_{sp} = 18,56 + 17,23 \text{ Zn}_{\text{extractos}}$	0,99	0,0036
$\%G_{sp} = 19,31 + 824,08 \text{ Cr}_{\text{extractos}}$	0,96	0,0375
$\%G_{sv} = 15,24 + 20,88 \text{ Zn}_{\text{extractos}}$	0,99	0,0243
$\%G_{sv} = 16,20 + 996,86 \text{ Cr}_{\text{extractos}}$	0,99	0,0500

%G<sub>sp</sub>: porcentaje de germinación de *Sesbania punicea*, %G<sub>sv</sub>: porcentaje de germinación de *Sesbania virgata*

### 2.3. b. Bioensayo de fitotoxicidad de suelo

Los resultados del ensayo de fitotoxicidad obtenidos con los extractos de suelos contaminado y enmendado se presentan en los Cuadros 2.3.b.1, 2.3.b.2 y 2.3.b.3. El Cuadro 2.3.b.1, en general muestra que a las 48 hs de incubación, los porcentajes de germinación de *S. punicea* y *S. virgata* fueron superiores al 100 %. Adicionalmente, se observó que a lo largo de la incubación, las semillas de *S. punicea* y *S. virgata* mostraron diferentes tendencias en el porcentaje de germinación frente a los elevados contenidos de MP. En tal sentido, para *S. punicea*, el mejor momento para determinar el %G, fueron las 48 hs, mientras que para *S. virgata* fueron las 72 hs.

Cuadro 2.3.b.1: Porcentaje de germinación de semillas de ambas especies de *Sesbania* en función al período de incubación. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos para determinado momento.

Porcentaje de Germinación (%G)				
Tratamiento	Horas de incubación (h)			
<i>Sesbania punicea</i>	48	72	96	168
SC	173,5 a	130,6	102,0 ab	76,4 bc
SC+CB	169,9 a	125,0	66,6 b	49,5 c
SC+FF	181,0 a	117,2	104,9 ab	82,7 bc
SC+CB+FF	125,9 ab	123,9	111,6 ab	96,1 ab
<i>Sesbania virgata</i>				
SC	167,1 a	152,8	150,0	132,3
SC+CB	117,7 ab	150,6	147,9	132,3
SC+FF	70,2 b	115,2	132,9	128,5
SC+CB+FF	116,3 ab	147,4	150,0	132,3

suelo contaminado (SC), suelo contaminado + compost de biosólido (SC + CB), suelo contaminado + fertilizante fosfatado (SC + FF) y suelo contaminado + compost de biosólido + fertilizante fosfatado (SC + CB + FF).

Según se observa en el Cuadro 2.3.b.1, al inicio del bioensayo de germinación (48 horas), *S. punicea* mostró mayor porcentaje de germinación en todos los tratamientos, en comparación con *S. virgata* ( $p = 0,0171$ ). Al comparar los porcentajes de germinación entre especies, se observó que *S. punicea* germinó en un 3,6% más para el tratamiento sin enmiendas y 157,8% más para el tratamiento con aplicación de ambas enmiendas, con respecto a *S. virgata*.

No obstante, a medida que transcurrió la incubación, se observó que *S. virgata* incrementó su poder germinativo, ya que los porcentajes de germinación obtenidos a las 72 hs fueron mayores en comparación con los obtenidos a las 48 hs (Cuadro 2.3.b.1).

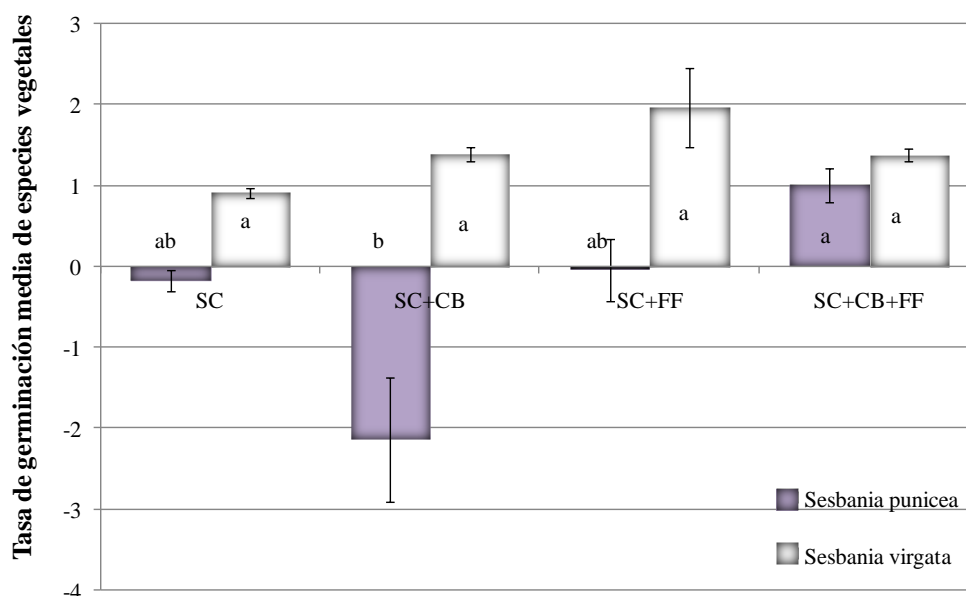


Figura 2.3.b.1: Tasa media de germinación (TGM) luego de transcurridas las 168 hs del bioensayo de germinación, para *Sesbania punicea* y *Sesbania virgata*. Valores negativos de TGM indica la muerte de semillas germinadas. SC = suelo contaminado, CB = compost de biosólido, FF = fertilizante fosfatado.

Por otro lado, al considerar la Tasa Media de Germinación (TMG) y el Índice de velocidad de Germinación (IVG), se encontraron diferencias significativas entre ambas especies de *Sesbania* ( $p= 0,0038$  y  $p= 0,0035$ , respectivamente) (Figura 2.3.b.1 y Cuadro 2.3.b.2). Por un lado, se observó que la TGM de *S. virgata* fue superior a la de *S. punicea* para todos los tratamientos, siendo significativamente superior para el tratamiento con aplicación de CB (Figura 2.3.b.1). Cabe destacar, que si bien la TGM de *S. punicea* decreció en los tratamientos de suelo contaminado y con aplicación de enmiendas por separado, en el tratamiento con aplicación de enmiendas de manera combinada, aumentó, siendo solamente un 55% menor con respecto al tratamiento de control. Además, la TGM de *S. virgata*, fue mayor en los tratamientos con aplicación de enmiendas, separadas o combinadas, con respecto al tratamiento de suelo contaminado sin aplicación de enmiendas. De hecho, este último fue el que mostró la menor tasa de incremento, siendo menor, en al menos un 75% con respecto a los tratamientos con aplicación de enmiendas.



Cuadro 2.3.b.2: Índice de Velocidad de Germinación (IGV, 40 semillas) de semillas de *Sesbania punicea* y *Sesbania virgata*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

Índice de Velocidad de Germinación (IVG)		
Tratamientos	<i>Sesbania punicea</i>	<i>Sesbania virgata</i>
SC	7,44 abc	9,17 a
SC+CB	6,14 c	8,83 ab
SC+FF	7,64 abc	7,53 abc
SC+CB+FF	7,28 bc	8,78 ab

suelo contaminado (SC), suelo contaminado + compost de biosólido (SC + CB), suelo contaminado + fertilizante fosfatado (SC + FF) y suelo contaminado + compost de biosólido + fertilizante fosfatado (SC + CB + FF).

Por otro lado, el IVG siguió el mismo patrón que la TGM. En general, el IVG de *S. virgata* también fue superior a la de *S. punicea*, siendo otra vez, el tratamiento con aplicación de CB superior significativamente (Cuadro 2.3.b.2). Con respecto a la aplicación de enmiendas, el IVG de *S. virgata* fue ligeramente menor en estos tratamientos con respecto al tratamiento sin aplicación de enmiendas.

Al evaluar la elongación de las radículas, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, así como tampoco entre especies a lo largo de todo el bioensayo de germinación (Cuadro 2.3.b.3). Al inicio del bioensayo de incubación, la elongación de las raíces en la especie *S. virgata* fue ligeramente mayor en comparación con la elongación de raíces de *S. punicea*.

Cuadro 2.3.b.3: Porcentaje de longitud radical de ambas especies de *Sesbania* en función al período de incubación.

Porcentaje de longitud radical (%LR)				
Tratamiento	Horas de incubación			
	48 h	72 h	96 h	168 h
<b><i>Sesbania punicea</i></b>				
SC	1,21	1,38	1,03	0,69
SC+CB	0,98	0,87	0,90	0,75
SC+FF	1,41	1,50	1,28	0,81
SC+CB+FF	1,04	1,03	1,00	0,77
<b><i>Sesbania virgata</i></b>				
SC	1,74	1,41	1,03	0,91
SC+CB	1,68	1,28	0,99	0,76
SC+FF	1,88	1,17	0,64	0,6
SC+CB+FF	1,33	0,95	0,75	0,65

suelo contaminado (SC), suelo contaminado + compost de biosólido (SC + CB), suelo contaminado + fertilizante fosfatado (SC + FF) y suelo contaminado + compost de biosólido + fertilizante fosfatado (SC + CB + FF).

Si bien a las 48 hs, la elongación de raíces para *S. virgata* superó a las de *S. punicea* en un 25% para todos los tratamientos, al final del ensayo (168 h), solo los tratamientos sin aplicación de enmiendas y con aplicación de compost de biosólido, se diferenciaron favorablemente, en un 31,9% y en un 1,5%, respectivamente.

Cuadro 2.3.b.4: Porcentaje de longitud radical acumulado (%LR) de (a) *Sesbania punicea* y (b) *Sesbania virgata*, obtenido con los extractos de suelo contaminado y enmendado a lo largo del ensayo de incubación.

Porcentaje de Longitud Radical acumulado (%LR)				
Tratamiento	Horas de incubación (h)			
<i>Sesbania punicea</i>	48	72	96	168
SC	1,21	2,58	3,61	4,30
SC+CB	0,98	1,86	2,76	3,51
SC+FF	1,41	2,91	4,19	5,01
SC+CB+FF	1,04	2,07	3,07	3,84
<i>Sesbania virgata</i>				
SC	1,74	3,15	4,19	5,10
SC+CB	1,68	2,96	3,95	4,71
SC+FF	1,88	2,24	2,88	3,49
SC+CB+FF	1,33	2,28	3,02	3,68

suelo contaminado (SC), suelo contaminado + compost de biosólido (SC + CB), suelo contaminado + fertilizante fosfatado (SC + FF) y suelo contaminado +compost de biosólido + fertilizante fosfatado (SC + CB + FF).

Asimismo, dentro de cada especie vegetal, en general se observó que el incremento acumulado en la elongación radicular, superó el 150% a las 168 horas de incubación (Cuadro 2.3.b.4).

Por último, el Índice de Germinación, incrementó con el tiempo de incubación en *S. virgata*, y al final del experimento superó al de *S. punicea* en todos los tratamientos ( $p=0,0016$ ), siendo la menor diferencia en el tratamiento sin aplicación de enmiendas (1,9%) (Cuadro 2.3.b.5 y Cuadro 2.3.b.6).

Cuadro 2.3.b.5: Índice de germinación de ambas especies de *Sesbania* en función al período de incubación. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

Índice de Germinación (IG)				
Tratamiento	Horas de incubación			
<i>Sesbania punicea</i>	48 h	72 h	96 h	168 h
SC	165,19 a	116,78	108,77	115,76 bc
SC+CB	177,54 ab	161,40	77,69	67,25 c
SC+FF	144,01 ab	89,82	88,52	104,44 bc
SC+CB+FF	132,81 ab	140,27	133,37	142,47 abc
<i>Sesbania virgata</i>				
SC	113,02 ab	114,16	143,98	144,99 abc
SC+CB	78,07 ab	128,86	152,91	184,24 ab
SC+FF	54,93 b	131,66	225,94	211,68 a
SC+CB+FF	89,44 b	155,43	199,38	209,12 a

suelo contaminado (SC), suelo contaminado + compost de biosólido (SC + CB), suelo contaminado + fertilizante fosfatado (SC + FF) y suelo contaminado + compost de biosólido + fertilizante fosfatado (SC + CB + FF).

En particular, a las 168 horas se observó el IG de *S. virgata*, fue un 29,56% mayor que el IG de *S. punicea* en el tratamiento con aplicación de fertilizante fosfatado, y un 15,99% mayor en el tratamiento con aplicación de ambas enmiendas en conjunto. Por otro lado, cabe aclarar que la diferencia del IG entre especies fue menor en el tratamiento sin aplicación de enmienda (1,9%). No obstante, en ambas especies, desde el inicio del experimento, el IG superó el 50% para todos los tratamientos (Cuadro 2.3.b.6).

Cuadro 2.3.b.6: Índice de germinación acumulado (IG) de (a) *Sesbania punicea* y (b) *Sesbania virgata*, obtenido a partir del porcentaje de germinación (%G) y del porcentaje de longitud radical (%LR). Las líneas verticales indican el error estándar.

Índice de Germinación acumulado (IG)				
Tratamiento	Horas de incubación (h)			
<i>Sesbania punicea</i>	48	72	96	168
SC	165,2	282,0	390,7	506,5
SC+CB	177,5	338,9	416,6	483,9
SC+FF	144,0	233,8	322,3	426,8
SC+CB+FF	132,8	273,1	406,5	548,9
<i>Sesbania virgata</i>				
SC	113,0	227,2	371,2	516,1
SC+CB	78,1	206,9	359,8	544,1
SC+FF	54,9	168,3	394,2	605,9
SC+CB+FF	89,4	244,9	444,3	653,4

suelo contaminado (SC), suelo contaminado + compost de biosólido (SC + CB), suelo contaminado + fertilizante fosfatado (SC + FF) y suelo contaminado + compost de biosólido + fertilizante fosfatado (SC + CB + FF).

### 2.3. c. Características químicas de suelos y extractos

Las concentraciones biodisponibles de los MP estudiados en las muestras de suelo con o sin aplicación de enmiendas, se muestran en el Cuadro 2.3.c.1. A diferencia del Cr, la aplicación al suelo de compost y fertilizante fosforado, solos o combinados, disminuyeron significativamente la disponibilidad de Cu y Zn con respecto al suelo sin aplicación de enmiendas ( $p= 0,028$  y  $p= 0,05$ , respectivamente). Cabe aclarar que las enmiendas utilizadas presentaron niveles de MP menores a los considerados como tóxicos por estándares internacionales (European Union 1986, USEPA 1995), por lo que la incorporación de estas enmiendas a los suelos no modificó inicialmente los niveles biodisponibles de los metales en el suelo.

Cuadro 2.3.c.1: Contenidos de metales pesados disponibles (mg metal  $\text{kg}^{-1}$  suelo) en los distintos tratamientos, luego de los ciclos de humedecimiento y secado (3 meses). Letras distintas significan diferencias significativas entre tratamientos, para cada metal.

Tratamientos	Metales pesados biodisponibles (mg $\text{kg}^{-1}$ )		
	Cu	Zn	Cr
SC	7,56 a	636,80 a	0,79 a
SC+CB	4,82 b	522,00 ab	1,19 a
SC+FF	5,16 ab	520,67 b	1,40 a
SC+CB+FF	4,86 b	471,00 b	0,82 a

suelo contaminado (SC), suelo contaminado + compost de biosólido (SC + CB), suelo contaminado + fertilizante fosfatado (SC + FF) y suelo contaminado + compost de biosólido + fertilizante fosfatado (SC + CB + FF).

Los contenidos totales de MP en los distintos extractos provenientes de suelo (Cuadro 2.3.c.2), presentaron variaciones significativas. Por un lado, la aplicación de enmiendas al suelo contaminado disminuyó significativamente los contenidos totales de Cu y Zn en los extractos ( $p < 0,0001$  para ambos metales). El rango de decrecimiento del Cu fue de 21,06 y 30%, y el del Zn fue de 46,8 y 55,8%, observándose, en ambos metales, el máximo valor de disminución para el tratamiento con aplicación de compost y de fertilizante inorgánico simultáneamente.

Cuadro 2.3.c.2: Características químicas de los extractos utilizados en el bioensayo de germinación de *S. virgata* y *S. punicea*. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos, para el pH, la CE y para cada metal. (ND = no detectado).

Tratamientos	pH	CE (ds m <sup>-1</sup> )	Cu	Zn	Cr
			(mg kg <sup>-1</sup> )		
H <sub>2</sub> O destilada	6,01	0,02	ND	ND	ND
SC	5,06 d	0,91 a	5,27 a	138,40 a	2,08 a
SC+CB	5,37 b	0,86 b	4,16 b	73,60 b	1,50 a
SC+FF	5,26 c	0,77 c	3,81 bc	62,80 b	1,34 a
SC+CB+FF	5,42 a	0,65 d	3,69 c	61,10 b	1,30 a

Suelo Contaminado (SC); Suelo Contaminado + Compost Biosólido (SC + CB); Suelo Contaminado + Fertilizante Fosfatado (SC + FF) y Suelo Contaminado + Compost de Biosólido + Fertilizante Fosfatado (SC + CB + FF).

Del mismo modo, existió tendencia de disminución del Cr con la aplicación de enmiendas, y el máximo porcentaje de disminución obtenido fue observado en el tratamiento con aplicación de ambas enmiendas (37,5%). Debido a la alta variabilidad de las concentraciones de Cr en suelos y extractos, no se pudieron establecer relaciones lineales significativas entre ellos.

Cabe destacar, que los resultados de el Cuadro 2.3.c.2 se complementan con los de el Cuadro 2.3.c.3, donde se muestran las relaciones lineales y positivas que fueron establecidas entre las concentraciones biodisponibles de Cu y Zn de los suelos y las concentraciones totales de los mismos en los respectivos en los extractos.

Cuadro 2.3.c.3: Análisis de regresión de los metales biodisponibles y de los extractos utilizados en el bioensayo de germinación de *S. virgata* y *S. punicea*. Nivel de significancia =  $p < 0,05$ , NS= diferencias no significativas.

Ecuación de regresión	R <sup>2</sup>	Nivel de significancia
$Cu_{\text{extracto}} = 0,1346 + 0,0515 Cu_{\text{suelo}}$	0,8898	0,013
$Zn_{\text{extracto}} = -18,572 + 0,0502 Zn_{\text{suelo}}$	0,9222	0,039
$Cr_{\text{extracto}} = 0,219 - 0,0607 Cr_{\text{suelo}}$	0,2518	NS

$Cu_{\text{extracto}}$  = contenido de cobre en el extracto;  $Cu_{\text{suelo}}$  = contenido de cobre en el suelo;  $Zn_{\text{extracto}}$  = contenido de cinc en el extracto;  $Zn_{\text{suelo}}$  = contenido de cinc en el suelo

Según los análisis de regresión entre la concentración de MP y los parámetros vegetales, las especies vegetales respondieron de manera diferente. Por un lado, al inicio del experimento, la concentración de Cu, Zn y Cr presente en los extractos se relacionó positivamente con el IG de *S. punicea*. Por otro lado, a las 168 h la concentración de Cu, Zn y Cr se relacionó inversamente lineal con el IG de *S. virgata* (Cuadro 2.3.c.4).

Cuadro 2.3.c.4: Análisis de regresión entre los metales biodisponibles y los parámetros medidos a las 48 y 168 hs del bioensayo de germinación de *S. punicea* y *S. virgata*. Nivel de significancia,  $p < 0,05$ .

Ecuación de regresión	R <sup>2</sup>	Nivel de significancia
$IG_{Sp(48h)} = -125,47 + 552,58 \text{ Cu}$	0,999	<0,001
$IG_{Sp(48h)} = 18,31 + 10,71 \text{ Zn}$	0,988	0,01
$IG_{Sp(48h)} = -63,24 + 1104,30 \text{ Cr}$	0,997	0,002
$\%LR_{Sv(168h)} = -0,049 + 1,82 \text{ Cu}$	0,911	0,046
$IG_{Sv(168h)} = 3,67 - 4,22 \text{ Cu}$	0,971	0,015
$IG_{Sv(168h)} = 2,56 - 0,08 \text{ Zn}$	0,931	0,035
$\%LR_{Sv(168h)} = 0,17 + 3,63 \text{ Cr}$	0,908	0,049
$IG_{Sv(168h)} = 3,18 - 8,47 \text{ Cr}$	0,967	0,018

$IG_{Sp}$  = índice de germinación de *Sesbania punicea*;  $\%LR_{Sv}$  = porcentaje de longitud radical de *Sesbania virgata*;  $IG_{Sv}$  = índice de germinación de *Sesbania virgata*.

Además, la aplicación de las enmiendas tuvo efectos positivos tanto en el pH como en la CE (Cuadro 2.3.c.2). Se observó que la aplicación de enmiendas al suelo contaminado incrementó significativamente el pH ( $p < 0,001$ ), pasando de ser un suelo ácido a medianamente ácido. Además, se observó que ese incremento de pH fue entre un 13 y 44% mayor cuando las enmiendas se aplicaron simultáneamente. En cuanto a la CE, la aplicación conjunta también evidenció un mayor efecto comparado con enmiendas por separado, ya que disminuyó significativamente la concentración de sales solubles con respecto a los demás tratamientos ( $p < 0,001$ ). A pesar que se encontraron relaciones lineales inversas entre el pH y la concentración de metales en los extractos, estas no fueron estadísticamente significativas, y solamente se encontró relación lineal negativa significativa entre pH y %G en *S. punicea* ( $R^2 = 0,97$ ;  $p = 0,014$ ).

## 2.4. DISCUSION

### 2.4.a. Producción y testeo de la fitotoxicidad del compost de biosólido

El mayor número de semillas germinadas encontrado en el tratamiento CBII, podría ser el resultado de una disminución temporaria en la actividad metabólica de los microorganismos (Helfrich et al. 1998), lo cual disminuiría la fitotoxicidad del compost. Al igual que lo hallado por Zubillaga y Lavado (2005) en un ensayo de fitotoxicidad utilizando raigrass, no se encontraron relaciones negativas entre la concentración de Cr y Zn y el índice de germinación; ya que las concentraciones de los MP analizados fueron muy bajas, encontrándose por debajo de valores que Wong y Bradshaw (1982) y los estándares internacionales (European Union 1986; USEPA 1995) consideraron como fitotóxicos. Sin embargo, en los tratamientos CBI y CBIII los efectos inhibitorios observados en la germinación de semillas podrían deberse a la presencia de sustancias

fitotóxicas no consideradas, como por ejemplo la formación de ácidos volátiles orgánicos, contenidos de amonio, o de sales (Varnero et al. 2007). Asimismo, la presencia de Cu, pudo inhibir el desarrollo vegetal, ya que la acumulación de Cu en la corteza y paredes celulares radicales pudieron producir lesiones en la estructura de la membrana.

Según Zucconi et al. (1981), aquellos tratamientos que presentan un IG  $\geq$  al 80%, indicarían que el material utilizado está libre de sustancias fitotóxicas. Lo contrario ocurriría con valores menores o iguales al 50%. Valores intermedios corresponderían a cantidades moderadas de fitotóxicos (Varnero et al. 2007). En función a este supuesto, las etapas tempranas y tardías del compostaje utilizado en este ensayo, presentaron sustancias que pudieron afectar la germinación de las semillas. En etapas tempranas, la germinación pudo verse afectada por la presencia de compuestos tóxicos que no se han metabolizado completamente, debido a la biodegradación insuficiente de la materia orgánica (Varnero et al. 2007). En el compost maduro, al producirse disminución de volumen por pérdida de humedad y descomposición de la materia orgánica, se pudieron concentrar ciertos elementos tóxicos no degradables. Sin embargo, cabe aclarar, que esto no implica que utilizar compost afecte el normal desarrollo de los cultivos, todo lo contrario, en experimentos de fitotoxicidad de mayor tiempo se observó que no afectó a los parámetros medidos sino que sólo se generó un retraso en la germinación (Zubillaga y Lavado 2006). Asimismo, la aplicación de compost maduro presenta ventajas adicionales a la aplicación de materia orgánica no estabilizada ya que no compite en su descomposición con los nutrientes para los cultivos y además mejora las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, disminuyendo la susceptibilidad de erosión (Zucconi et al. 1981; The US Composting Council 2001).

#### 2.4. b. Bioensayo de fitotoxicidad del suelo

Si bien los niveles de MP presentes en los extractos no afectaron negativamente el estadio inicial del desarrollo fisiológico de las especies vegetales estudiadas (germinación y elongación radicular), el poder germinativo de *S. virgata* superó al de *S. punicea* para los tratamientos de suelo contaminado y con aplicación de enmiendas. Además, para *S. virgata* tampoco existieron efectos subletales en los parámetros de toxicidad señalados por Calow (1993), tales como inhibición en la formación de hojas nuevas, clorosis o necrosis. Por el contrario, se produjo una estimulación en la germinación de esta especie.

Cabe destacar, que si bien existieron elevados porcentajes de germinación en ambas especies de *Sesbania* bajo condiciones contaminantes, la TMG y el IVG de *S. punicea* indicaría un efecto de estrés en las semillas. Es probable que este comportamiento se debiera a la restricción de la disponibilidad de agua en el sustrato por efecto osmótico, por lo cual la semilla inició la germinación pero luego pudo ocurrir muerte de la raíz o del embrión por la escasez de agua (Braga et al. 2009). El poder germinativo diferencial de las especies, observada frente a los altos contenidos de MP, podría atribuirse a que diferentes especies presentan distintos factores genéticos o fisiológicos, que pueden condicionar las respuestas de germinación de la plantas frente al estrés de los metales (Duarte et al. 2012).

Al igual que lo encontrado por otros autores en diferentes especies vegetales, los resultados de este experimento mostraron que la elongación de raíces fue el parámetro de fitotoxicidad más sensible, siendo esta variación 10 % mayor que en el porcentaje de

germinación (Zubillaga y Lavado 2006; Di salvatori et al. 2008; Teaca y Bordilau 2008). Según Varnero et al. (2007), la presencia de metabolitos moderadamente fitotóxicos son incapaces de impedir la germinación de las semillas, pero en cambio pueden limitar el desarrollo de sus radículas, lo cual podría explicar la disminución en la tasa de crecimiento radical observado en ambas especies de *Sesbania* a partir de las 72 horas (Cuadro 2.3.b.3).

Diversos autores sostienen que el índice de germinación es un indicador más completo para describir el potencial fitotóxico de un sustrato, ya que integra el porcentaje de germinación relativo y el crecimiento relativo de raíces (Zucconi et al. 1981; Tiquia 2000; Emino y Warman 2004; Varnero et al. 2006). En tal sentido, un criterio de clasificación de fitotoxicidad basado en aquellos extractos que muestran un  $IG \geq$  al 80%, indicaría que los mismos están libres de sustancias fitotóxicas, o los tendrían en muy baja concentración (Zuconni et al. 1985). Lo contrario ocurriría con valores menores o iguales al 50%; es decir, con presencia significativa de sustancias fitotóxicas. Según Varnero et al. (2007), valores intermedios corresponden a cantidades moderadas de fitotóxicos. En *S. punicea*, el mejor momento para la determinación del porcentaje de germinación y del de la longitud radical, así como del cálculo del índice de germinación fue a las 48 horas, ya que estos parámetros no mostraron una evolución positiva con el tiempo de incubación. Contrariamente, en *S. virgata* como el índice de germinación incrementó con el tiempo, se consideró más adecuado determinar los parámetros vegetales a partir de las 72 horas, siendo las 168 horas el momento más indicado para su determinación.

En función a estos criterios, y a que al final del experimento, *S. punicea* y *S. virgata* mostraron índices de germinación mayores al 80%, ambas especies vegetales pueden germinar y desarrollar sus estadios iniciales en suelos multicontaminados (Zucconi et al. 1981b). En tal sentido, y considerando que estas especies demostraron tolerar altas concentraciones simultáneas de Cu, Zn y Cr, se plantea su utilización para estudios de remediación a corto plazo (Chan et al. 2003).

#### **2.4.c. Características químicas de los sustratos y extractos**

Según diferentes autores, diversas enmiendas sintéticas así como varios subproductos de actividades antrópicas, pueden ser utilizadas para la inmovilización de MP del suelo (Cao et al. 2003; Ciccu et al. 2003). En concordancia con estos autores, y según lo mostrado en el Cuadro 2.3.c.4, se podría afirmar que las enmiendas utilizadas inmovilizan al Cu y al Zn presentes en el suelo, ya que la disponibilidad de los mismos disminuye entre un 18 y un 36 % una vez aplicadas. Esta disminución en los contenidos biodisponibles de Cu y Zn con aplicación de enmiendas, podría explicarse mediante dos procesos principalmente: por la formación de complejos estables con las sustancias húmicas del compost, o por la formación de precipitados con los fosfatos del fertilizante inorgánico (Madrid 1999; Basta et al. 2001; Gilbert et al. 2003). Por otro lado, las enmiendas disminuyeron por lo menos un 20% el contenido total de los metales en los extractos, pero la combinación de las enmiendas orgánica e inorgánica redujo entre un 10 y 20% más comparado con las aplicaciones individuales de enmiendas, evidenciando el beneficio de aplicarlas de manera combinada. Según Bolan et al. (2003) la aplicación conjunta de enmiendas genera un aumento de cargas negativas en la matriz del suelo, lo que produce incremento en la adsorción de MP. En tal sentido, y al igual que lo encontrado por Ahmad et al. (2011) los resultados obtenidos en nuestro trabajo podría minimizar o impedir la absorción por las plantas. Cabe destacar, que si bien el IG no fue



menor al 50%, éste disminuyó en función a la mayor disponibilidad de MP, indicando efecto negativo que los MP pueden causar en el desarrollo vegetal (Cuadro 2.3.c.4).

Según los análisis de regresión, la concentración de Cu y Zn en los extractos aumentó con el incremento de la concentración biodisponible en el suelo. Por consiguiente, los resultados obtenidos en el bioensayo de germinación estarían reflejando lo ocurrido en el suelo, hipotetizando que durante la obtención de los extractos, no ocurrieron procesos de adsorción y/o precipitación o solubilización, que estén afectando la disponibilidad de los MP. Si bien hasta el presente no existe bibliografía que demuestre el uso de estos bioensayos en suelos contaminados, estos datos podrían ayudar para lograr una mayor amplitud de uso de los mismos.

La modificación de las características químicas estudiadas con la aplicación de enmiendas concordaron con los resultados encontrados por otros autores (Bolan y Duraisamy 2003; Castaldi et al. 2005). Mientras el pH de los extractos aumentó, la CE disminuyó con la aplicación de las enmiendas, y en particular con la aplicación de ambas enmiendas en conjunto. Cabe destacar, que sumado a la disminución de la CE con la aplicación de enmiendas, estos valores siempre estuvieron por debajo de  $1 \text{ dSm}^{-1}$ . Esto indicaría que la CE no afectó el desarrollo de las plantas, ya que en general la mayoría de las especies vegetales viven normalmente en un rango de  $0\text{-}2 \text{ dS m}^{-1}$ , y solo empiezan a verse afectadas con una conductividad equivalente a  $4\text{-}8 \text{ dS m}^{-1}$  (Richards 1954; Rhoades y Lovejoy 1990; Shu et al. 2001). En un trabajo realizado en México por la Secretaría de Fomento Agropecuario (OEIDRUS 2009), demostraron que se necesita una concentración de sales solubles superior a  $8 \text{ dS m}^{-1}$  para afectar el rendimiento de las plantas de *Sesbania*. Por eso, al no encontrarse relación con los parámetros vegetales medidos, los rangos de pH y CE medidos en los extractos no tuvieron influencia en los resultados obtenidos en el bioensayo de germinación.

## 2.5. CONCLUSIONES

Ambos bioensayos de germinación permitieron evidenciar los efectos fitotóxicos de la presencia simultánea de determinados MP en el suelo. El primer bioensayo permitió seleccionar el estado del compost más adecuado para la germinación y crecimiento de las radículas vegetales. El segundo bioensayo permitió concluir que los extractos utilizados reflejan las condiciones del suelo contaminado y remediado con enmiendas, y que la combinación de enmiendas orgánica e inorgánica tuvo un efecto significativo para la estabilización de MP en el suelo, evidenciada a través del efecto sobre el proceso de germinación.

El bioensayo de germinación permitió diferenciar las respuestas de germinación de ambas especies frente a las distintas condiciones del suelo. Sin embargo, la disminución en la disponibilidad de los MP en suelos no fue la condición más determinante en la germinación de las especies, ya que ambas especies de *Sesbania* fueron capaces de germinar y desarrollar su estadio inicial, así como de tolerar los altos contenidos de MP.

Ambas especies de *Sesbania* fueron capaces de germinar en medios contaminados. Sin embargo, *S. virgata* sería la más adecuada para utilizarse como especie pionera en proyectos de remediación a corto plazo, ya que demostró germinar y desarrollarse normalmente en medios contaminados con Cu, Zn y Cr, al igual que otras especies de *Sesbania* originarias de otras partes del mundo.



Esquema 2.5: Esquema resumen del rechazo o no rechazo de las hipótesis planteadas al inicio del capítulo.

## **Parte A: Estudios sobre *Sesbania sp.***

### **Capítulo 3. Interacciones sinérgicas y antagónicas en mezclas binarias de metales pesados\***

---

\* Parte de este capítulo ha sido publicado

Branzini, A., Santos González, R. y Zubillaga, M.S. 2012. Absorption and Translocation of Copper, Zinc and Chromium by *Sesbania virgata*. Journal of Environmental Management, 102: 50-54.

### 3.1. INTRODUCCION

Dependiendo de la fuente de contaminación, los MP pueden ser introducidos al suelo como mezclas de tres a cinco elementos, y en muchos casos, estos metales pueden estar disponibles simultáneamente (Gomes et al. 2001). Por eso, la retención selectiva y la adsorción competitiva son dos procesos trascendentes para determinar la disponibilidad de los MP para las plantas y su movimiento a través del suelo. Estos dos procesos se refieren a que la adsorción de cada metal de la mezcla en un mismo sitio activo del suelo (coloides), estará determinada por la afinidad entre el metal (solute) y el coloide (sorbente), por la concentración y por las cargas electrostáticas de cada metal (Barceló 2000; Orroño y Lavado 2009). Usualmente, al comparar la adsorción competitiva de metales con su comportamiento como monometal, se encuentra que la adsorción es menor en los sistemas competitivos, estando más afectados los metales más móviles (Antoniadis et al. 2007). En particular, se conoce que el Zn es relativamente móvil en los suelos, el Cu presenta mayor inmovilidad y el Cr en la mayoría de los casos es adsorbido fuertemente al suelo (Nissen y Lepp 1997; Watson et al. 1999). Diversos estudios mostraron que la retención y la baja solubilidad de los MP en el suelo, son afectadas por diferentes parámetros tales como pH, concentración del MP, capacidad de intercambio aniónico, contenido de materia orgánica y mineralogía del suelo (Zhu 1999; Martínez y Motto 2000; Kookana y Naidu 2001; Parat et al. 2002; Fageria et al. 2002). Asimismo, el aumento de la concentración de sales en la matriz del suelo, incrementa la competencia entre los cationes metálicos por los sitios de unión, controlando la solubilidad de los mismos (Ghosh y Singh 2005). Por consiguiente, esta disponibilidad debe evaluarse considerando al suelo como un sistema dinámico en donde sus componentes pueden interaccionar entre sí (Otitoloju 2003).

Por otro lado, los experimentos que incluyen mezcla de MP, reflejan la contaminación de los ecosistemas de manera más real que los experimentos donde se testean los tóxicos individualmente (Spurgeon et al. 1994; Paquin et al. 2002). Análogamente, diferentes autores mostraron que los efectos tóxicos de la mezcla no pueden predecirse a partir de los efectos individuales de los contaminantes, ya que la toxicidad de la mezcla puede ser igual (aditividad), superior (sinergismo) o inferior (antagonismo) a la suma de efectos de cada componente por separado (Kraak et al. 1994; Ince et al. 1999; Otitoloju 2003). Además, estos efectos pueden ser inocuos, letales o subletales y con frecuencia, estos daños suelen ser más perjudiciales a nivel poblacional que individual, ya que afectan al desarrollo o a la reproducción (Bernal et al. 2007). Por consiguiente, los riesgos ambientales asociados a la contaminación combinada van a depender de cuales sean los constituyentes de la mezcla contaminante y de cuales sean los organismos afectados (Jensen y Sverdrup 2002). Asimismo, sumado a la presencia combinada, estos riesgos ambientales pueden ser mayores por su acumulación en capas superficiales y largo tiempo de residencia en el suelo donde se producen máximas interacciones con las plantas y la actividad humana (Gupta y Gupta 1998; Gleyzes et al. 2001; Bolan et al. 2003).

Como respuesta a este problema, la implementación del uso de plantas (fitorremediación) como estrategia remediadora, puede mitigar los efectos negativos producidos por la contaminación. La estrategia de fitorremediación implica diferentes mecanismos de descontaminación. Hutchinson et al. (2001) identificaron 5 grupos principales de fitorremediación, de los cuales, solamente dos pueden aplicarse a suelos contaminados con MP: la fitoextracción y la fitoestabilización (Nagendran et al. 2006). La fitoextracción consiste en la absorción y translocación de los MP desde raíces hacia las partes aéreas de las plantas, para luego ser cosechadas (Pulford y Watson 2003). La

fitoestabilización, en cambio, incluye la reducción de la movilidad y disponibilidad de los MP por absorción y acumulación dentro de las raíces de las plantas, o por la transformación en especies no móviles dentro de la zona radical del suelo, ya sea mediante procesos de sorción, precipitación, complejación, o reducción de la valencia del metal (Alvarenga et al. 2008; Jadía y Fulekar 2009). Cabe aclarar, que durante la fitoestabilización, existe baja translocación de MP a sus tejidos superiores, ya que en las plantas fitoestabilizadoras pueden ocurrir mecanismos de exclusión, restringiendo la absorción o la translocación a parte aérea; o pueden desarrollarse mecanismos de inmovilización interna, compartimentarización o detoxificación mediante la producción de compuestos que promueven enlaces estables con metales (Marschner 1995; Küpper et al. 1999; Pulford y Watson 2003). En tal sentido, también es importante aclarar que la absorción y acumulación de MP en los órganos de las plantas dependen de diversos factores, los cuales incluyen a la temperatura, textura del suelo, materia orgánica, pH y disponibilidad de elementos químicos, así como de los requerimientos fisiológicos de las plantas (Cobbett y Goldsbrough 2002; Kumar Sharma et al. 2007).

Asimismo, la reducción en la movilidad de los contaminantes, impide su migración hacia aguas subterráneas o aire, y reduce su biodisponibilidad previniendo su ingreso a la cadena trófica. Consecuentemente, el mecanismo de fitoestabilización prevendría el riesgo ecológico derivado de la dispersión de la contaminación por erosión, escurrimiento o percolación hacia otros medios, siendo útil en suelos donde existe gran cantidad de contaminantes como Pb, As, Cd, Cr, Cu, y Zn (Mench et al. 2006; Wei et al. 2008).

En general, las plantas adecuadas para fitoestabilizar deben presentar tolerancia al MP que se desea mitigar; rápido crecimiento, elevada producción de biomasa; además de presentar un desarrollo que posibilite una eficiente cosecha (Garbisu y Alkorta 2001). Asimismo, deben ser capaces de i) disminuir la cantidad de agua que percola a través de la matriz del suelo, que puede resultar en la formación de un lixiviado tóxico, ii) actuar como barrera para prevenir el contacto directo de los animales y hasta humanos con el suelo contaminado, y iii) prevenir la erosión del suelo y la distribución de los MP hacia otras áreas (Raskin y Ensley 2000). Las principales ventajas de la fitoestabilización es que no se requiere la disposición final de la biomasa vegetal con MP, que se evita la transferencia de MP a la cadena trófica, y que es muy efectiva preservando los cuerpos de agua, tanto subterráneos como superficiales, por la reducción en la dispersión de la contaminación (Jadía y Fulekar 2009).

Como se mencionó en la Introducción General y en el Capítulo 2, la utilización de plantas nativas de la región estudiada, en comparación con especies introducidas, constituye una estrategia importante para la fitorremediación, ya que en general, las primeras presentan mejor supervivencia, crecimiento y reproducción bajo condiciones de estrés del sitio (Yoon et al. 2006). Resulta de interés la utilización de arbustos de la especie *Sesbania virgata* originarios de la Región centro-este de la Argentina (Faggi et al. 2009). Tal como se indicó en los capítulos anteriores, diversos trabajos en variadas partes del mundo, demostraron que especies del género *Sesbania* pueden crecer y desarrollarse en sitios contaminados con MP (Wong et al. 1992; Yang et al. 1997; Ye et al. 2001; Sahi et al. 2007). Sin embargo, todavía no se ha investigado la capacidad estabilizadora de *Sesbania virgata* en sistemas nativos de la Región Pampeana.

Por las razones expuestas hasta aquí, la evaluación de la existencia de interacciones entre metales y su efecto combinado en la biomasa de *S. virgata*, puede ser una herramienta útil para determinar la eficiencia fitoestabilizadora de esta planta nativa.

Estas interacciones pueden estudiarse también, bajo cultivo de hidroponía. Astolfi et al. (2004) estudiaron la toxicidad de MP en plantas superiores, basándose en el uso de cultivos hidropónicos, ya que bajo este sistema de cultivo no existen dificultades al momento de medir la biodisponibilidad real o efectiva del MP, considerando el efecto único del vegetal y el metal. Mediante este sistema evaluaría el efecto de las interacciones (sinergismo-antagonismo), sin considerar al suelo como modificador de esta relación.

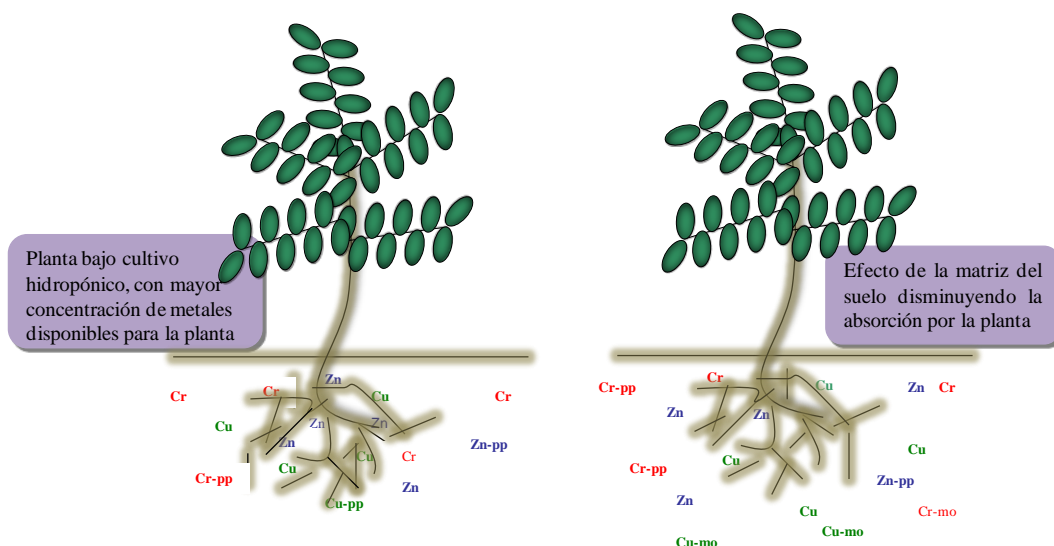
Se considera relevante la utilización de enfoques empíricos como el Factor de Bioconcentración (BCF) y el Factor de Translocación (TF) (Marchiol et al. 2004), para determinar la capacidad remediadora de las plantas y en este caso de *S. virgata*.

## Objetivos

1. Estimar el efecto de diferentes mezclas binarias entre Cu, Zn y Cr sobre la adsorción de los mismos a la matriz del suelo. Asimismo, determinar si dichos metales en dichas mezclas, afectan el crecimiento de *S. virgata* y la absorción.
2. Evaluar el efecto de la matriz del suelo en la absorción, translocación y bioconcentración de mezclas binarias de MP en *S. virgata*, en un cultivo bajo hidroponía.

## Hipótesis

1. Cuando altas concentraciones de MP se encuentran en el suelo en distintas mezclas binarias, cada uno de ellos presenta mayor concentración disponible, incrementándose la absorción por *S. virgata*. Esta absorción no afectará el desarrollo y crecimiento de las plantas. Las diferentes mezclas de MP no afectarán la traslocación en la planta.
2. Las interacciones sinérgicas entre metales serán mayores en la solución hidropónica, por lo que el cultivo de *S. virgata* bajo sistema hidropónico absorberá mayores concentraciones de MP comparado con el cultivo en suelo. Sin embargo, el factor de translocación será el mismo evidenciando un efecto fitoestabilizador de *S. virgata*.



Esquema 3.1: Esquema comparativo del cultivo de *Sesbania* bajo un sistema de hidroponía y en suelo.

### 3.2. MATERIALES Y METODOS

Se realizaron dos experimentos complementarios, uno contemplando la utilización de suelo con elevado contenido artificial de MP y otro ensayo en hidroponía. Como tratamiento control se utilizó por un lado, el suelo prístino con el contenido natural de MP y por otro lado, solución nutritiva sin agregado de MP.

#### 3.2. a. Experimento en suelo

Se recolectaron 50 kg de muestra (cinco muestras compuestas de 10 kg cada una) de los primeros 20 cm de un suelo Hapludol típico de una superficie prístina de 4 ha, procedente de la localidad de Pehuajó en la provincia de Buenos Aires ( $35^{\circ}48'40.92''S$ ,  $61^{\circ}53'55.85''O$ ) (Cuadro 3.2.1 y Cuadro 3.2.2).

Cuadro 3.2.1: Características físico-químicas del suelo Hapludol típico utilizado en este experimento. Todos los datos están expresados en base seca (PS = peso de la masa seca).

Arcilla	Limo	Arena	Textura	CIC	pH	CE	MO <sub>total</sub>	C <sub>orgánico</sub>	N <sub>total</sub>
		(%)		(cmol <sup>+</sup> kg <sup>-1</sup> )	(1:2.5, H <sub>2</sub> O)	(dS m <sup>-1</sup> )	(%)		(g kg suelo <sup>-1</sup> )
19,2	23,2	57,6	Franco-Arenosa	22,1± 0,06	5,19±0.13	0,57± 0,01	1,92±0,03	1,45±0,61	2,2±0,02

Nota: CIC= capacidad de intercambio cationico; CE= conductividad eléctrica; MO<sub>total</sub>= materia orgánica total; C<sub>orgánico</sub>= carbono orgánico total; N<sub>total</sub>= nitrógeno total.

Las muestras se tomaron al azar, dentro de un área con condiciones homogéneas. Las mismas se dejaron secar al aire a temperatura ambiente, se homogeneizaron y

pasaron por tamiz de 2 mm. A fin de semejar a un suelo contaminado artificialmente, se adicionaron a las muestras soluciones de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{H}_2\text{CrO}_4$ , para lograr concentraciones finales de 60 y 700  $\text{mg kg}^{-1}$  Cu, 125 y 1050  $\text{mg kg}^{-1}$  Zn y 50 y 116  $\text{mg kg}^{-1}$  Cr. Estos niveles de MP se seleccionaron en base a diferentes datos bibliográficos de la Región Pampeana. Para los niveles de baja concentración se utilizaron los datos del trabajo de Lavado et al. (1998), y para los niveles altos de concentración de MP (máximos niveles encontrados en suelos de la Región Pampeana) se recurrió a estudios realizados por Llosa et al. (1990) y Giuffré et al. (2005). A fin de acercarse a condiciones de equilibrio de los MP con la matriz del suelo se realizaron ciclos de humedecimiento y secado cada cinco días, durante un período de 3 meses (Martínez y Motto 2000).

Cuadro 3.2.2: Contenido de metales pesados en suelo, y niveles máximos de metales pesados totales para suelos agrícolas, establecidos por leyes internacionales y de Argentina (Ley de Residuos peligrosos: Ley N° 24.051).

	Metales pesados ( $\text{mg kg PS}^{-1}$ )				
	Hapludol típico		Ley 24051*	USEPA	UE
	Disponible	Total	Total	Total	Total
Cu	0,051	17,0	100-500	750-1000	25-93
Zn	0,040	38,2	600-1500	1400-1870	75-200
Cr	<0,001	14,9	750	1500	60-150

\*Niveles para suelos con uso agrícola e industrial.

El experimento se realizó en macetas de  $250 \text{ cm}^3$ , incorporando 200 g del suelo contaminado con Cu, Zn y Cr en las distintas concentraciones indicadas. Sobre una mesada de cultivo ubicada a 0,60 m por debajo de 12 tubos fluorescentes de luz fría que generaban, en promedio, 2414 luxes al ras de la mesada y 3076 luxes a 0,12 m de la misma, se dispusieron las macetas, en las cuales se plantaron 3 plántulas de *S. virgata* con tamaño similar por maceta (peso promedio=0.28 gr) (20 días). La temperatura media fue de  $25^\circ\text{C}$ . A los 30 días se realizó la cosecha destructiva de las macetas.

Los tratamientos resultantes fueron: Suelo Control sin enriquecimiento,  $\text{Cu}_{\text{baja}}$ ,  $\text{Cu}_{\text{alta}}$ ,  $\text{Zn}_{\text{baja}}$ ,  $\text{Zn}_{\text{alta}}$ ,  $\text{Cr}_{\text{baja}}$ ,  $\text{Cr}_{\text{alta}}$ ,  $\text{Cu/Zn}_{\text{baja}}$ ,  $\text{Cu/Zn}_{\text{alta}}$ ,  $\text{Cu/Cr}_{\text{baja}}$ ,  $\text{Cu/Cr}_{\text{alta}}$ ,  $\text{Zn/Cr}_{\text{baja}}$  y  $\text{Zn/Cr}_{\text{alta}}$ ; refiriéndose con baja y alta a las dosis mencionadas anteriormente. Estos tratamientos fueron distribuidos completamente al azar en la cámara de cultivo y se realizaron con tres repeticiones cada uno.





Imagen 3.2.1: Disposición al azar de las macetas utilizadas en el experimento de suelo en mesa de cultivo, bajo condiciones controladas de luz y temperatura

### 3.2. b. Experimento en Hidroponía

El experimento consistió en la sustitución del suelo por un sustrato artificial (agua, aire y nutrientes=solución nutritiva). Al igual que el experimento anterior, este experimento en hidroponía se realizó en mesa de cultivo bajo condiciones controladas de luz (en promedio 2414 luxes al ras de la mesada y 3076 luxes a 0,12 m de la misma) y temperatura ( $T_{media} = 25^{\circ}\text{C}$ ), utilizando recipientes de telgopor de  $1000\text{ cm}^3$  de capacidad. En la tapa de cada uno de ellos se realizaron 10 orificios de 2 cm de diámetro donde se colocaron las plántulas sostenidas con algodón (envuelto en su tallo). En cada contenedor (unidad experimental) se colocaron un conjunto de 10 plántulas de *Sesbania virgata* de tamaño similar (20 días de crecimiento), que se distribuyeron bajo un diseño de bloques completamente al azar con 4 repeticiones. La composición de la solución nutritiva dentro del contenedor donde crecieron las plantas de *S. virgata* estuvo basada en una modificación de la solución nutritiva de Hoagland (Johnson et al. 1957), incluyendo:  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (2,5 mM),  $\text{CaSO}_4$  (1,2 mM),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5 mM), Fe EDTA (5  $\mu\text{M}$ ),  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (3,5 M),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,07 mM)  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (7,5  $\mu\text{M}$ ),  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1,5  $\mu\text{M}$ ),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1,5  $\mu\text{M}$ ),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,5  $\mu\text{M}$ ),  $\text{MoO}_3$  (0,01  $\mu\text{M}$ ). Para prepararla se utilizó agua destilada y se le adicionaron soluciones de MP, a fin de obtener al mismo rango de concentraciones de MP que en el experimento anterior de suelo. Cada contenedor contó con un sistema de aireación permanente de la solución nutritiva (Imagen 3.2.2).

Por consiguiente, resultaron los mismos tratamientos que en el experimento de suelo: Solución Control sin enriquecimiento,  $\text{Cu}_{baja}$ ,  $\text{Cu}_{alta}$ ,  $\text{Zn}_{baja}$ ,  $\text{Zn}_{alta}$ ,  $\text{Cr}_{baja}$ ,  $\text{Cr}_{alta}$ ,  $\text{Cu/Zn}_{baja}$ ,  $\text{Cu/Zn}_{alta}$ ,  $\text{Cu/Cr}_{baja}$ ,  $\text{Cu/Cr}_{alta}$ ,  $\text{Zn/Cr}_{baja}$  y  $\text{Zn/Cr}_{alta}$ . Luego de 240 hs se realizó la cosecha destructiva de los contenedores, considerando suficiente ese tiempo para visualizar los efectos de los MP en las plantas (Xia y Ma 2006).



Imagen 3.2.2: Disposición de los contenedores utilizados para el experimento de hidroponía en mesa de cultivo, bajo condiciones controladas de luz y temperatura. Visualización del sistema de aireación de las soluciones.

### 3.2. c. Absorción y translocación por la planta

La transferencia de los MP desde las raíces hasta la parte aérea de *S. virgata* se estimó a través del cálculo del factor de translocación (TF) (Marchiol et al. 2004):

$$TF = \frac{(C_{aerea})}{(C_{raíz})}$$

Donde  $C_{aerea}$  es la concentración de MP en la parte aérea y  $C_{raíz}$  en las raíces de la planta.

La transferencia de los MP desde el suelo contaminado o la solución contaminada hasta la planta se discutió en términos del factor de bioconcentración (BCF) (Zayed et al. 1998):

$$BCF = \frac{(C_{planta})}{(C_{medio\ externo})}$$

Donde  $C_{planta}$  es la concentración del MP en los tejidos de la planta y  $C_{medio\ externo}$  es la concentración inicial en el medio externo.

### 3.2. d. Análisis químicos en ambos experimentos

#### -Experimento en suelo

Los metales del suelo fueron extraídos de las muestras de suelo mediante solución de  $CaCl_2$  0.01M (10:1) a 20°C (Houba et al. 1990). Luego del agitado y centrifugado de las muestras, se determinó el contenido total de Cu, Zn, y Cr en el centrifugado mediante espectrofotometría de absorción atómica en un equipo Perkin Elmer Analyst 300. Se determinaron pH en suspensión suelo: agua (1: 2.5) mediante equipo Thermo Orion 420A+ y contenido de sales solubles totales, estimado por

conductividad eléctrica (CE) en suspensión suelo: agua (1: 2.5), mediante equipo Metter Delta 320.

Al momento de la cosecha se registró el peso total de la planta, así como también en los distintos órganos de la misma (tallo+hojas y raíz). Se calculó el Índice de Tolerancia (IT) de *S. virgata* en el suelo contaminado como el porcentaje del peso húmedo de las plantas de los distintos tratamientos con respecto al suelo control.

$$IT = \frac{(PH_{MP})}{(PH_{\text{suelo control}})}$$

Donde  $PH_{MP}$  es el peso húmedo de las plantas creciendo en suelo con MP y  $PH_{\text{suelo control}}$  es el peso húmedo de las plantas del tratamiento control. El contenido de humedad de la planta fue calculado a partir de la diferencia entre el peso fresco y el peso seco de la misma. Las concentraciones totales de MP en planta, en ambos experimentos, se determinaron mediante digestión ácida siguiendo la metodología de Baker y Smith (1974). Las concentraciones de MP en todos los compartimentos vegetales fueron calculadas en base al peso seco.

#### *-Experimento en hidroponía*

El pH se mantuvo dentro del rango considerado como óptimo para el desarrollo vegetal (5,20 - 6,30) en cada una de las soluciones nutritivas; y la CE se encontró por debajo de los 3,0 dS m<sup>-1</sup> (Herrera 2000). Los contenidos de MP en la solución hidropónica fueron determinados mediante espectrofotometría de absorción atómica.

A las 240 hs de colocadas las plantas en los contenedores se realizó la cosecha destructiva de los mismos, y al igual que en el experimento de suelo, se registró el peso total de la planta, y el de los distintos órganos de la misma (tallo+hojas y raíz). El peso total también fue relativizado al tratamiento control para determinar el índice de tolerancia (IT) de la planta.

$$IT = \frac{(PH_{MP})}{(PH_{\text{solución control}})}$$

Donde  $PH_{MP}$  es el peso húmedo de las plantas creciendo en solución con MP y  $PH_{\text{solución control}}$  es el peso húmedo de las plantas del tratamiento control. La humedad de la planta fue calculada de la misma manera que en el experimento de suelo, y las concentraciones totales de MP en planta también se determinaron mediante digestión ácida siguiendo la metodología de Baker y Smith (1974). Las concentraciones de MP en todos los compartimentos vegetales fueron calculadas en base al peso seco.

### **3.2. e. Análisis Estadístico**

Los efectos de los tratamientos en ambos experimentos fueron determinados mediante ANOVA. Se utilizaron contrastes ortogonales a fin de comparar las medias

entre tratamientos. Cuando fue necesario, las varianzas fueron estabilizadas mediante transformación logarítmica.

### 3.3. RESULTADOS

#### 3.3. a. Experimento en suelo

La Figura 3.3.1. muestra la concentración total de MP en parte aérea (tallo+hoja), y en raíces de las plantas de *S. virgata* luego de la cosecha destructiva de las macetas. En la misma, se pudo observar que los órganos aéreos de la planta acumularon menor cantidad de MP que las raíces. Las concentraciones de Cu, Zn y Cr en la biomasa aérea y en los diferentes tratamientos oscilaron entre 3,13 y 61,94 mg kg<sup>-1</sup> para el Cu, 36,63 y 867,19 mg kg<sup>-1</sup> para el Zn, y 4,63 y 26,19 mg kg<sup>-1</sup> para el Cr, mientras que en las raíces, estas concentraciones fluctuaron entre 316,75 y 557,70 mg kg<sup>-1</sup> para el Cu, 33,04 y 1469,8 mg kg<sup>-1</sup> para el Zn, y 4,04 y 160 mg kg<sup>-1</sup> para el Cr (Figura 3.3.1). La mayor concentración de Cu en tallo+hojas y raíces de las plantas fue observada cuando estaba acompañado por el Zn, en altas dosis (Figura 3.3.1 (a)).

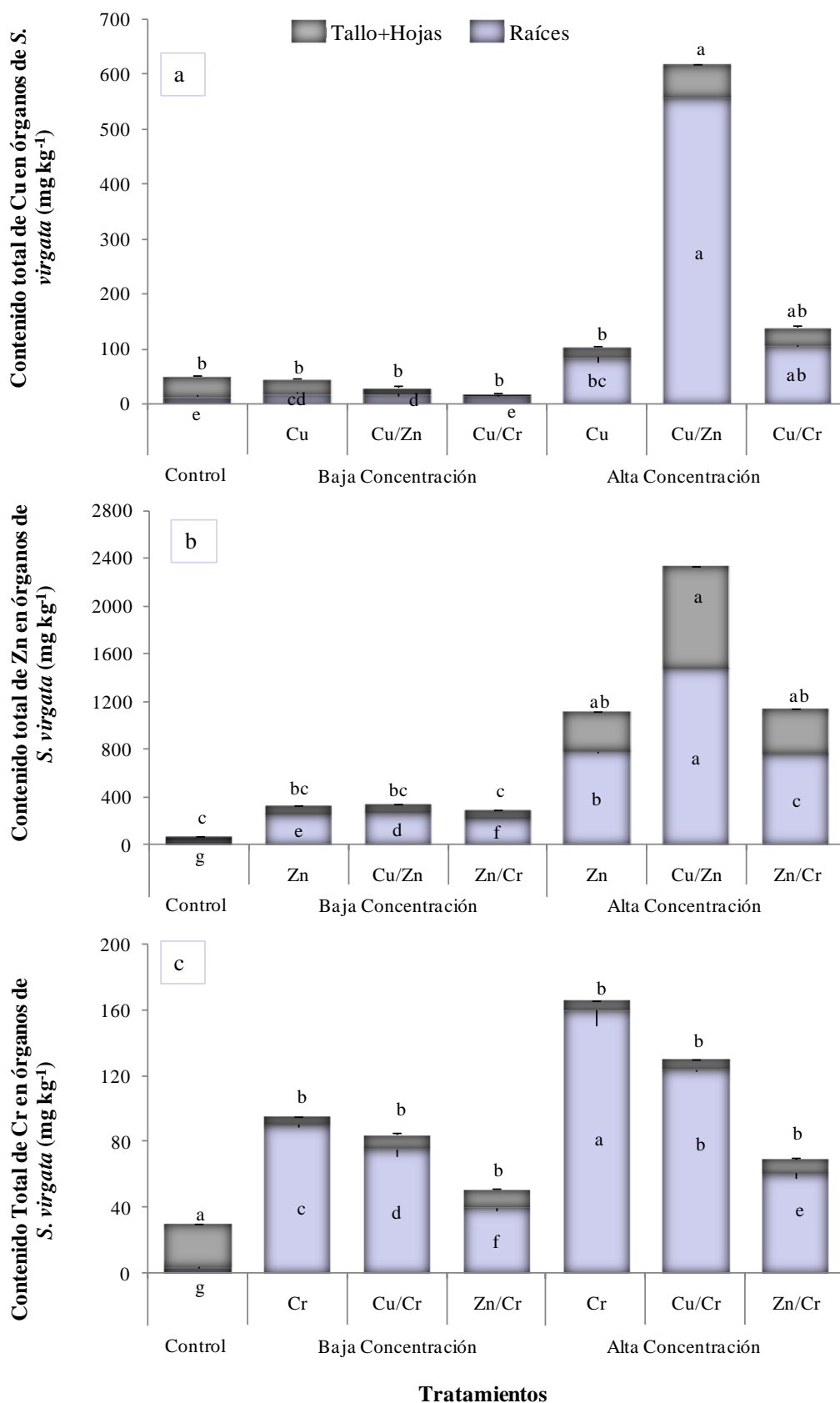


Figura 3.3.1: Concentración total de Cu (a), Zn (b) y Cr (c) en tallo+hojas y raíces de plantas de *S. virgata*, según los distintos niveles de concentración y las distintas combinaciones de MP en el suelo. Las barras verticales representan los desvíos estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para cada órgano de la planta ( $p < 0.05$ ).

Asimismo, se observó efecto dosis, ya que la concentración de Cu en la parte aérea y en la biomasa radicular fue significativamente mayor tanto cuando dicho metal se presentaba individual como en mezcla binaria, en altas dosis (Cuadro 3.3.1). La concentración total de Zn tuvo un patrón de variación diferente al del Cu. A altas dosis, la concentración en tallo+hojas fue mayor que a bajas dosis, cuando estaba o no acompañado con Cu, pero no presentó el mismo patrón en combinación con Cr (Figura 3.3.1 (b), Cuadro 3.3.1). A diferencia del comportamiento de estos dos metales, la mayor concentración de Cr se encontró en las raíces de *S. virgata* en el tratamiento individual y con alta dosis. Asimismo, en los tratamientos de Cr como mezcla binaria, las concentraciones en las raíces fueron menores (Figura 3.3.1 (c), Cuadro 3.3.1).

Cuadro 3.3.1: Análisis de varianza de los datos y contrastes comparando las concentraciones de metales pesados en tallos+hojas y raíces de plantas de *Sesbania virgata*, cuando los mismos fueron incorporados al suelo individualmente o en mezcla binaria.

ANOVA (valores de p)	Cu	Zn	Cr
Tallo+hojas	0,0042	0,0006	0,004
Raíces	<0,001	<0,001	<0,001
<b>Contrastes</b>			
<b>Tallo+hojas</b>			
Cu & Cu/Zn baja vs. Cu & Cu/Zn alta	<0,001		
Cu & Cu/Cr baja vs. Cu & Cu/Cr alta	<0,001		
Zn & Cu/Zn baja vs. Zn & Cu/Zn alta		0,0002	
<b>Raíces</b>			
Cu & Cu/Zn baja vs. Cu & Cu/Zn alta	0,0025		
Cu & Cu/Cr baja vs. Cu & Cu/Cr alta	0,0234		
Cr & Zn/Cr baja vs. Cr & Zn/Cr alta			0,0157

La estimación de la translocación de los MP en la planta y de la absorción por la planta, se especifica en el Cuadro 3.3.2. El factor de translocación de metales presentó un comportamiento similar tanto para el Cu, como para el Zn y Cr. En general, en todos los tratamientos, los valores de los factores de translocación obtenidos fueron < 1,0. Estos valores indican que los MP se acumularon en mayores concentraciones en las raíces de las plantas, en comparación con tallo+hojas. Por otro lado, los valores provenientes del cálculo del factor de bioconcentración promedio en las raíces de *S. virgata* fueron Zn (1,4) > Cr (1,1) > Cu (0,5), siendo las raíces más efectivas que la parte aérea en la acumulación de metales pesados, y en particular de Zn y Cr (Cuadro 3.3.2).

Cuadro 3.3.2: Factor de Translocación y de Bioconcentración (TF y BCF) en diferentes órganos de *S. virgata* bajo tratamientos de suelo contaminado con metales pesados, tanto en baja (Baja) y alta (Alta) concentración, como en forma individual y en mezcla binaria.

Niveles MP		Cu			Zn			Cr		
		TF	BCF Raíz	BCF Tallo+hojas	TF	BCF Raíz	BCF Tallo+hojas	TF	BCF Raíz	BCF Tallo+hojas
	Control	2,18	1,41	3,07	1,11	0,78	0,87	6,48	0,68	4,40
Cu	Baja	1,11	0,34	0,41						
	Alta	0,23	0,12	0,03						
Zn	Baja				0,32	2,03	0,64			
	Alta				0,42	0,75	0,32			
Cr	Baja							0,05	1,81	0,09
	Alta							0,03	1,39	0,05
Cu/Zn	Baja	0,55	0,34	0,19	0,26	2,18	0,56			
	Alta	0,11	0,80	0,09	0,59	1,40	0,83			
Cu/Cr	Baja	0,18	0,29	0,05				0,11	1,52	0,17
	Alta	0,30	0,16	0,05				0,05	1,08	0,06
Zn/Cr	Baja				0,30	1,79	0,55	0,28	0,80	0,22
	Alta				0,51	0,72	0,37	0,14	0,53	0,08

Los niveles de MP biodisponibles se muestran en el Cuadro 3.3.3. De modo general, se observó que con altas concentraciones, la disponibilidad de Cu y Zn incrementó cuando ambos metales estaban presentes en forma de mezcla binaria, comparado con la disponibilidad de estos metales en forma individual. No obstante, el Cr estuvo más disponible para las plantas en co-presencia con Zn. En cuanto al pH y a la CE del suelo, se encontraron dentro de los rangos normales para un suelo Hapludol típico (5,15-5,52; 0,55-0,69 dS m<sup>-1</sup>, respectivamente), y no presentaron diferencias significativas entre tratamientos, ni relaciones con la disponibilidad de los MP.

Cuadro 3.3.3: Concentración media de metales pesados biodisponibles en diferentes tratamientos de suelo contaminado con metales en forma individual y mezcla binaria, y en el tratamiento control (Baja= baja concentración de metal pesado, Alta = alta concentración de metal pesado).

		Concentración de MP disponibles (mg kg <sup>-1</sup> )		
Tratamientos		Cu	Zn	Cr
Control		3,34 ± 0,02	1,15 ± 0,05	<LD
Cu	Baja	3,98 ± 0,11		
	Alta	17,41 ± 0,73		
Zn	Baja		23,70 ± 1,00	
	Alta		377,00 ± 46,00	
Cr	Baja			0,13 ± 0,01
	Alta			0,23 ± 0,02
Cu/Zn	Baja	3,52 ± 0,16	24,35 ± 0,95	
	Alta	22,23 ± 0,67	539,50 ± 31,50	
Cu/Cr	Baja	3,22 ± 0,10		0,14 ± 0,02
	Alta	15,76 ± 0,24		0,25 ± 0,01
Zn/Cr	Baja		21,35 ± 0,35	0,16 ± 0,04
	Alta		396,00 ± 11,00	0,29 ± 0,00

Con altas concentraciones de MP en el suelo, ya sea individual o en mezclas binarias, la concentración en los órganos de la planta aumentó significativamente (Figura 3.3.1). En particular, las plantas de *S. virgata* acumularon 39,9 y 165,7 mg Zn kg<sup>-1</sup> con baja y alta dosis de Zn, respectivamente. Asimismo, cuando el Zn se aplicó con Cu, las plantas acumularon 35,3 y 433,7 mg de Zn kg<sup>-1</sup>, respecto bajas y altas concentraciones. Cuando se aplicó baja y alta dosis de Cr, *S. virgata* acumuló 2,3 y 2,8 mg de Cr kg<sup>-1</sup> respectivamente.

En general, las plantas que se desarrollaron en los tratamientos con bajas concentraciones de MP obtuvieron mayor biomasa ( $p < 0,001$ , Figura 3.3.2) respecto a aquellas que lo hicieron con altas concentraciones. Por otro lado, en los tratamientos con mezcla binaria de MP a bajas dosis, no se observaron diferencias en la biomasa total de *S. virgata*. No obstante, en dichos tratamientos, la biomasa total de las plantas fue menor con respecto a aquellos en los que se aplicaron los metales pesados en forma individual. Las plantas de *S. virgata* que obtuvieron mayor biomasa total (0,858 g) fueron aquellas que crecieron en los tratamientos con bajas concentraciones de Cr individual. En cambio, las de menor biomasa total (0,085 g) fueron aquellas que crecieron en tratamientos donde se combinaron altas concentraciones de Cu y Zn. Cabe destacar que las plantas que crecieron con altos niveles de Cr individual, presentaron una mejor performance, lo cual se evidenció en la mayor biomasa de raíces y hojas respecto a los demás tratamientos de altas dosis ( $p < 0,001$ , Figura 3.3.2).



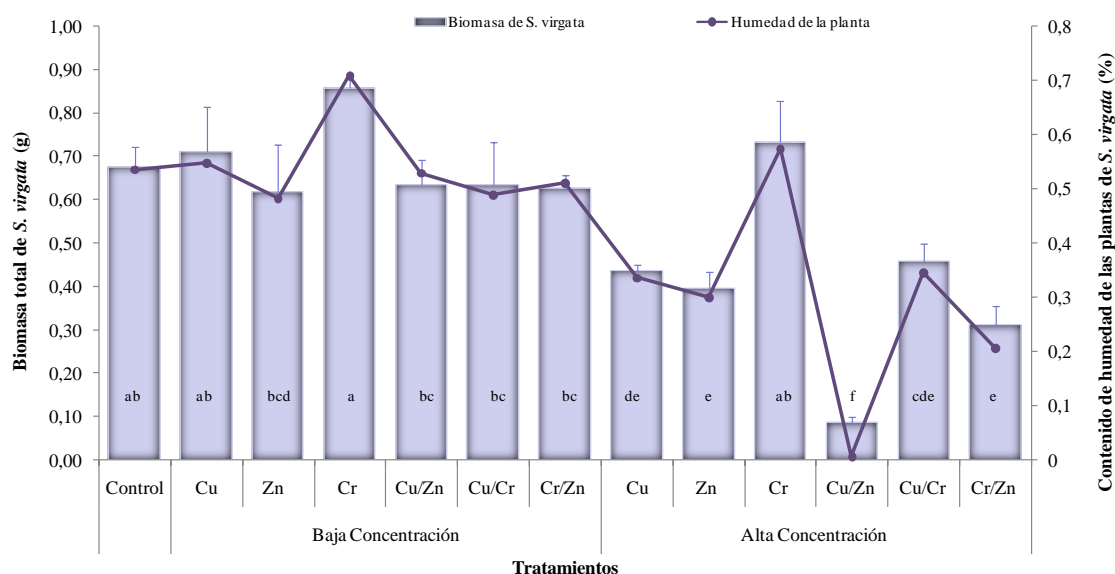


Figura 3.3.2: Efectos del estrés producido por metales pesados en la biomasa total de *S. virgata*, y contenido de humedad de las plantas (%). Los datos de biomasa son promedios, las líneas verticales indican el desvío estándar y letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

En particular, el IT para los tratamientos con bajas dosis de MP, superó el 90%, observándose un máximo de 127% para el tratamiento con Cr individual. Contrariamente, en los tratamientos con elevadas concentraciones de MP, el IT fue más variable, obteniéndose un mínimo de 13 % para el tratamiento Cu/Zn y un máximo de 108% para el tratamiento con Cr individual. Por otro lado, la humedad de las plantas fue diferente entre los tratamientos ( $p < 0.0001$ ), siguiendo el mismo patrón de variación que el observado en la biomasa total (Figura 3.3.2).

### 3.3. b. Experimento en Hidroponía

La acumulación de MP en los diferentes órganos de las plantas de *S. virgata*, se muestra en la Figura 3.3.3. Cabe destacar, que tanto el Cu como el Zn siguieron el mismo patrón de acumulación en la planta, el cual describe una mayor acumulación en las raíces en relación con tallo+hojas. Contrariamente, para el Cr el patrón de acumulación fue inverso al de los otros metales, siendo mayor en tallo+hojas.

A rasgos generales, se observó que los MP fueron más absorbidos por la planta, al ser incorporados a la solución hidropónica en forma individual, comparado con mezclas binarias. En particular, se observó que *S. virgata* absorbió Cu en menor cantidad cuando estaba en forma binaria con Cr en la solución hidropónica ( $p < 0.001$ ; Figura 3.3.1 (a)). Contrariamente, tanto el Zn como el Cr no presentaron marcadas diferencias de absorción ante la presencia de uno u otro MP (Figura 3.3.3 (b) y 3.3.3 (c)).

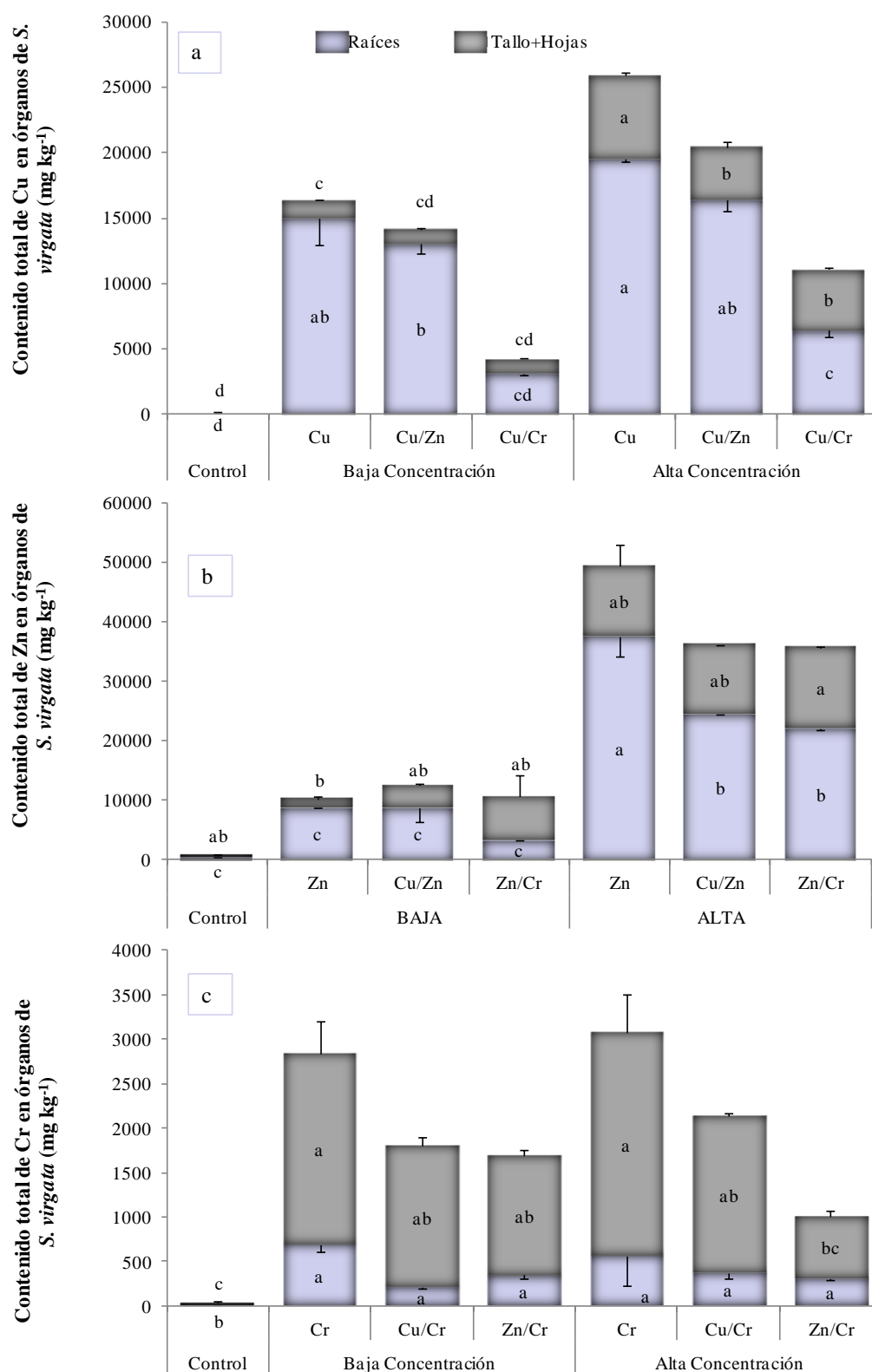


Figura 3.3.3: Concentración total de Cu (a), Zn (b) y Cr (c) en tallo+hojas y raíces de plantas de *S. virgata*, según los distintos niveles de concentración (Baja y Alta) y las distintas combinaciones de MP en la solución hidropónica. Las barras verticales representan los desvíos estándar, y letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada órgano de la planta ( $p < 0.05$ ).

Por otro lado, se evidenció un efecto dosis en el Cu, ya que su concentración en la biomasa aérea y radicular aumentó significativamente con el mayor nivel de estrés en la solución (Cuadro 3.3.4). Este efecto dosis se observó tanto en los tratamientos en los que los MP se presentaban en forma individual como en los que se presentaban en forma de mezcla binaria (Figura 3.3.3). También se observó efecto dosis para el Zn, ya que con altas dosis, la concentración en raíz fue mayor que a bajas dosis, tanto individualmente como en forma de mezcla binaria con los otros metales; pero a diferencia del Cu, su concentración en tallo+hojas solo fue mayor estando en forma individual o con Cu (Cuadro 3.3.4, Figura 3.3.3). Por el contrario, no se observó incremento significativo de la concentración de Cr en los órganos de la planta con el aumento de estrés en la solución hidropónica (Figura 3.3.3).

Cuadro 3.3.4: Análisis de varianza y contrastes comparando las concentraciones de MP en tallos+hojas y raíces de plantas de *S. virgata*, cuando los mismos fueron incorporados a la solución hidropónica individualmente o en mezcla binaria.

ANOVA (valores de p)	Cu	Zn	Cr
Tallo+hojas	<0,0001	0,0275	0,0011
Raíces	<0,0001	<0,0001	<0,0001
<b>Contrastes</b>			
<b>Tallo+hojas</b>			
Cu & Cu/Zn baja vs. Cu & Cu/Zn alta	0,0014		
Cu & Cu/Cr baja vs. Cu & Cu/Cr alta	<0,0001		
Zn & Cu/Zn baja vs. Zn & Cu/Zn alta		0,0045	
<b>Raíces</b>			
Cu & Cu/Zn baja vs. Cu & Cu/Zn alta	0,0025		
Cu & Cu/Cr baja vs. Cu & Cu/Cr alta	0,0033		
Zn & Cu/Zn baja vs. Zn & Cu/Zn alta		0,0042	
Zn & Cr/Zn baja vs. Zn & Cr/Zn alta		<0,0001	

Al igual que en el ensayo con suelo, el movimiento de los metales entre los tejidos de la planta y entre la solución y la planta, se estimaron a partir del factor de translocación y el de bioconcentración (Cuadro 3.3.5.). El Factor de Translocación, fue menor a 1 en aquellos tratamientos cuya solución nutritiva contenía MP. En cuanto al Zn, este factor también estuvo por debajo de 1, salvo en presencia simultánea con Cr a bajas concentraciones. En contraste a lo encontrado para Cu y Zn, para el Cr se observó que el factor de translocación estuvo por encima de 1 en todos los tratamientos estudiados (Cuadro 3.3.5.).

Cuadro 3.3.5: Factor de Translocación y de Bioconcentración (TF y BCF) en diferentes órganos de *S. virgata* bajo soluciones hidropónicas con metales pesados, adicionados tanto individualmente como en forma de mezcla binaria.

Niveles MP	Cu			Zn			Cr		
	TF	BCFRaíz	BCF Tallo+hojas	TF	BCFRaíz	BCF Tallo+hojas	TF	BCFRaíz	BCF Tallo+hojas
Control	0,71	2,97	8,43	0,72	25,98	72,07	10,0	2,85	28,53
Cu	Baja	0,10	2,24						
	Alta	0,32	0,27						
Zn	Baja			0,17	0,70	0,47			
	Alta			0,32	0,36	0,45			
Cr	Baja						3,13	0,13	1,61
	Alta						4,47	0,08	0,86
Cu/Zn	Baja	0,09	1,78	0,42	0,70	1,19			
	Alta	0,25	0,23	0,48	0,23	0,45			
Cu/Cr	Baja	0,35	0,39				7,66	0,04	1,27
	Alta	0,72	0,09				4,77	0,03	0,62
Zn/Cr	Baja			2,26	0,26	2,34	3,87	0,06	0,97
	Alta		2,97	0,62	0,21	0,52	2,23	0,03	0,25

En el Cuadro 3.3.5 también se presentan los valores obtenidos del BCF para cada uno de los metales. En particular, el movimiento de Cu desde la solución a la raíz, fue mayor a 1, individual o con bajas concentraciones de Zn. En cambio, el movimiento de Zn y Cr, fue mayor a 1 desde solución a tallo+hojas a bajas concentraciones de ambos MP (Cuadro 3.3.5). Por otro lado, si se consideran los valores promedio de BCF para todos los tratamientos, las raíces de *S. virgata* absorbieron MP de la solución hidropónica en el orden  $Zn > Cu > Cr$  ( $BCF = 4,1 > 1,1 > 0,5$  respectivamente). Asimismo, el BCF promedio en los tejidos aéreos de la planta (tallo+hojas) fue de  $11,1 (Zn) > 4,9 (Cr) > 1,6 (Cu)$ . En promedio, los BCF mostraron que la tasa de absorción de MP por parte de *S. virgata* fue mayor de solución a tallo+hojas y de solución a raíz para el Zn.

La Figura 3.3.4 muestra, que bajo hidroponía, todos los tratamientos adicionados con MP, tanto a bajas como a altas concentraciones, individuales o en forma de mezcla binaria, presentaron menor biomasa en comparación con el tratamiento control ( $p < 0,0001$ ). Asimismo, existió diferencia significativa entre la biomasa de *S. virgata* de los tratamientos con baja concentración y los de alta concentración. Las plantas de *S. virgata* que obtuvieron mayor biomasa total (6,3 g) fueron aquellas que crecieron en los tratamientos con bajos niveles de Zn individual. En cambio, las de menor biomasa (2,6 g) fueron aquellas que crecieron en el tratamiento Cu/Cr alta, seguidas por las que crecieron en el tratamiento Cu/Zn alta (2,8 g).

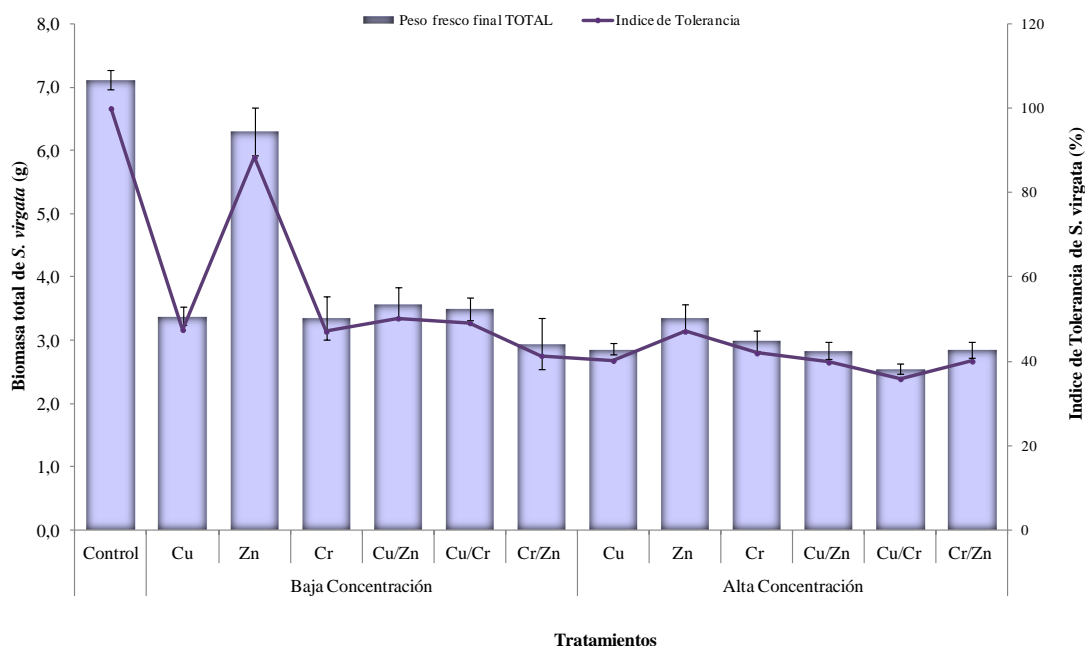


Figura 3.3.4: Efectos del estrés por MP en biomasa total de *S. virgata* en solución hidropónica, e Índice de Tolerancia de *Sesbania* expresado como el porcentaje relativo al tratamiento control. Los datos de biomasa total son promedios y letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

En este ensayo, al igual que en el ensayo de macetas con suelo, se calculó el IT de *S. virgata*. En particular, se observó que el IT para el tratamiento con adición de bajas dosis de Zn individual, superó el 80%. En cambio, en los tratamientos restantes, este índice no superó el 50%.

### 3.4. DISCUSION

#### 3.4. a. Experimento en suelo

Los datos mostrados en la Figura 3.3.1 sugieren que la presencia simultánea de Cu y Zn incrementó la capacidad de absorción de las plantas de *S. virgata*, indicando efectos sinérgicos entre ellos. Dichos resultados coinciden con los encontrados por Luo y Rimmer (1995), quienes demostraron que el incremento en la absorción de Zn debido a la adición de Cu es aproximadamente de un 20% y que la absorción de Cu incrementó con la adición de Zn. El Zn fue el metal que más se acumuló en la parte aérea de la planta, lo cual podría deberse a que es un micronutriente y se mueve relativamente fácil desde la raíz hasta las partes superiores de la planta (Orroño et al. 2012). Por el contrario, ya que el Cr fue más absorbido en los tratamientos individuales, podría existir relación antagónica entre los constituyentes de la mezcla binaria (Alloway, 1995; Orroño et al. 2012). Una posible explicación para esta tendencia es que en forma de mezcla binaria, la capacidad de ser absorbido de cada MP disminuyó por procesos competitivos (Flogeac et al. 2007).

La diferencia significativa observada en la acumulación de Cu, Zn y Cr en el sistema radicular de *S. virgata*, comparado con los órganos aéreos, podría indicar una

mayor eficiencia en la limitación de la translocación, evitando que alcancen los tejidos metabólicamente más activos de la partes aéreas (Cobbet y Goldsbrough 2002; Zhang et al. 2010). Asimismo, en un trabajo realizado por Gupta y Sinha (2006), se demostró, al igual que en el presente trabajo, que la acumulación de MP varió entre los órganos vegetales, acumulándose principalmente en la parte radicular. La acumulación de Cu, Zn y Cr observadas en el sistema radicular de *S. virgata* podría estar directamente relacionado con los mecanismos de compartimentación que impiden el transporte de metales a la parte aérea, los cuales podrían interferir en la actividad fotosintética de las plantas (Dias et al. 2010). En vista de esto, y considerando que la eficacia de la fitorremediación depende de la tolerancia de las plantas a los metales (Arienzo et al. 2004), este comportamiento podría indicar un buen potencial de estas especies para ser utilizadas como fitoestabilizadoras de los metales pesados presentes en el suelo. Además, basados en el BCF promedio de las raíces, y debido a que este factor es el parámetro básico utilizado para medir la eficiencia de acumulación en las plantas, al igual que lo encontrado por Zhang et al. (2010), estos resultados indicarían que *S. virgata* tiene un alto potencial de bioacumulación de Zn, siendo más eficiente para removerlo de los suelos (BCF = 1,4), con respecto al Cr (1,1) y Cu (0,5).

En este ensayo, la concentración de metales en raíces y tallo+hojas de *S. virgata* incrementó con el aumento de los niveles de MP en suelo (Figura 3.3.1 y Cuadro 3.3.1). Recientemente, Zhang et al. (2010), publicaron que la concentración de MP en raíces y tallo+hojas respondió linealmente al incremento en la concentración de MP en el suelo, indicando que la concentración de MP en el mismo tiene efectos significativos sobre la concentración en los tejidos de las plantas. Consecuentemente, la disponibilidad de los MP es un requerimiento crítico para que la absorción de los mismos ocurra y la fitorremediación sea efectiva (Kayser et al. 2000). Es importante destacar que la disponibilidad de los MP no se correlacionó con la CE ni con los valores de pH. Según los resultados encontrados por Zeng et al. (2011), los contenidos promedios de MP biodisponibles fueron aproximadamente los mismos cuando los valores de pH del suelo se encontraron dentro del rango 5,0 y 7,0. Sin embargo, una vez superado un valor 7,0 de pH, los contenidos de los metales disponibles disminuyeron significativamente. Consecuentemente, en función a los resultados de estos autores y a que en este trabajo el pH y la CE se encontraron dentro de los rangos normales para un suelo de la Región Pampeana, medianamente ácido (Panigatti 2010), no se puede afirmar que estos parámetros químicos hayan influido en la disponibilidad de MP en el suelo.

En el capítulo previo se demostró que la fitotoxicidad de MP no es un factor limitante para la germinación y elongación de raíces de *S. virgata*, ya que la germinación de las semillas superó el 100% y el Índice de Germinación fue mayor al 80%. Sin embargo, los resultados de la Figura 3.3.2 mostraron que su crecimiento fue inhibido en los tratamientos mezcla binaria de MP, con respecto a los tratamientos individuales. Según lo encontrado por Israr et al. (2011), los distintos niveles de inhibición podrían depender principalmente de la concentración y del tipo de combinación de MP. Si bien en los tratamientos con mezcla binaria de MP a bajas concentraciones, el índice de tolerancia superó el 90%, en la mezcla de Cu y Zn a altas concentraciones se evidenció el máximo decrecimiento (87,4%) en la biomasa de *S. virgata* respecto al tratamiento control. Al igual que lo encontrado por diferentes autores con otras especies vegetales, estas disminuciones en la biomasa de *S. virgata* confirman que la combinación de MP genera efectos fitotóxicos, como por ejemplo la temprana caída de hojas, evidenciando una mayor sensibilidad frente a esta mezcla de Cu y Zn (Dias et al. 2010; Orroño y Lavado 2010; Orroño et al. 2012). Asimismo, se podría

decir que las interacciones producidas entre Cu y Zn presentes en esta mezcla generaron una respuesta sinérgica en la disminución de la biomasa total de las plantas, ya que la suma de efectos individuales es inferior en un 10% al valor obtenido en el tratamiento mezcla binaria.

Por otro lado, cabe destacar que tanto a bajas como a altas concentraciones de Cr individual, el IT de las plantas de *S. virgata* con respecto al control, superó el 100%. Según Datta et al. (2011), la estimulación en el crecimiento de las plantas sucede a bajas concentraciones de Cr. Sin embargo, en este estudio se observó que esta estimulación no solo ocurre a bajas concentraciones de Cr disponible, sino que también ocurre a altas. Estos resultados confirman que, al igual que otras especies, *S. virgata* no solo es tolerante, sino que mejoran su performance cuando se desarrollan bajo altas concentraciones de Cr (Yang et al. 2003; Tang et al. 2012). En función a esto y a que no se observaron cambios morfológicos negativos en las plantas durante el experimento, se sugiere que estas plantas pueden crecer bien en suelos con concentraciones de 50 -116 mg kg<sup>-1</sup> de Cr, siendo de gran utilidad para la descontaminación de sitios contaminados con Cr (Yoon et al. 2006; Xia y Ma 2006).

Las concentraciones excesivas de MP causan estrés oxidativo, lo cual trae aparejado cambios en la permeabilidad de la membrana celular, conduciendo a las plantas a un estrés hídrico (Oncel et al. 2000; Tripathi et al. 2004). Esta explicación podría ser uno de los motivos a lo observado en la Figura 3.3.2, donde las plantas con menor biomasa total, también presentaron menor humedad.

### 3.4. b. Experimento en hidroponía

Según Zhu et al. (1999), los contaminantes inorgánicos como por ejemplo los MP pueden ser eficientemente removidos de la solución a través de la absorción y acumulación. Sin embargo, según la acumulación de MP observada en la Figura 3.3.3, se podría indicar que esta absorción y/o acumulación puede verse influenciada por la presencia simultánea de otros MP. En particular, debido a que *S. virgata* absorbió mayor cantidad de MP cuando éstos se encontraban en forma individual, comparado a si estaban en mezclas binarias, puede estimarse que existe un efecto antagónico de absorción entre los MP.

Al igual que en el experimento en suelo, y concordando con los resultados encontrados por Di Salvatore et al. (2012), se observó que con el incremento de concentración de MP en la solución hidropónica, existió aumento de la concentración de Cu y Zn en la planta, evidenciando efecto dosis. Por otro lado, para el Cr no se observó efecto dosis, por lo que se podría hipotetizar que existe un límite de absorción de este elemento por las plantas de *S. virgata*.

Los resultados obtenidos con el cálculo del factor de translocación, sugieren que grandes cantidades de Cu se acumulan principalmente en la raíz de *S. virgata*. Estudios previos demostraron que la baja translocación de Cu en plantas de *Sesbania sp.* es debida a que las raíces tienen alta afinidad por el Cu, por lo que la mayor parte queda retenido dentro de las mismas (Song et al. 2004; Sahi et al. 2007). Esto indicaría que las plantas tienen alta eficiencia en restringir la translocación, lo que evitaría el enriquecimiento de las partes metabólicamente más activas (parte aérea) con este metal (Cobbett y Goldsbrough 2002). A su vez, el factor de translocación indicó lo mismo para el Zn, por lo que se podría decir que las plantas de *S. virgata* presentaron menor translocación de Zn a partes aéreas, mediante mecanismos de compartimentación. Este

comportamiento de *Sesbania virgata* frente a altas concentraciones de Cu y Zn, indicaría un elevado potencial de esta especie para ser utilizada como fitoestabilizadora de estos MP (Dias et al. 2010). Sin embargo, cabe destacar, que en función de la elevada concentración de los MP en la solución, el contenido de los mismos en tallo+hojas de *S. virgata* fue muy elevado, siendo para el Cu  $> 1.000 \text{ mg kg}^{-1}$ , y para el Zn  $> 10.000 \text{ mg kg}^{-1}$  (Figura 3.3.3); por lo cual esta especie también podría considerarse hiperacumuladora de estos metales en medios acuosos (Kidd et al. 2007).

Contrariamente al Cu y al Zn, y a diferencia de lo encontrado por Shanker et al. (2003), el factor de translocación del Cr fue  $> 1$  (2,23-7,66), tanto para concentraciones bajas o altas ( $50$  o  $116 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ). Este resultado reveló que las raíces de *S. virgata* translocaron el Cr a la parte aérea, por lo que tendrían potencial bioacumulador de este metal en soluciones hidropónicas contaminadas con niveles similares a esos valores (Dias et al. 2010). Además, la concentración de Cr en la parte aérea de *S. virgata* superó los  $1000 \text{ mg kg}^{-1}$ , por lo que en cultivo hidropónico, esta especie podría comportarse como hiperacumuladora de Cr (Brooks 1998). También, a bajas y altas concentraciones, se observó que la planta transloca más Cu y Zn cuando se presentan en mezclas binarias con Cr, pero transloca más Cr cuando esta con Cu. Esto deja ver que estos MP presentaron un efecto sinérgico para la translocación dentro de la planta.

El BCF mostró resultados similares al ensayo con suelo. Basados en el promedio del BCF de toda la planta, las raíces fueron más eficientes en remover Zn de la solución nutritiva (BCF = 4,1), seguido por Cu (BCF = 1,1) y por Cr (BCF = 0,5).

Los resultados en la Figura 3.3.4 mostraron que el crecimiento de *S. virgata* fue inhibido por la incorporación de MP a la solución. En particular, y al igual que en el ensayo en suelo, en los tratamientos donde se incorporaron MP en altas concentraciones y en forma de mezcla binaria, se evidenció el máximo decrecimiento en la biomasa vegetal, el cual fue igual o mayor al 60% (Cu-Cr = 64,1%, Cu-Zn = 60,2%, Cr-Zn = 60,0%). Los resultados aquí encontrados demostraron que la sensibilidad de las plantas de *S. virgata* aumentó con la incorporación de altas concentraciones de MP en forma de mezcla binaria. Sin embargo, según los resultados, las interacciones entre los MP fueron antagónicas, ya que el efecto de los MP en forma de mezcla binaria sobre la biomasa total de las plantas, fue menor que la suma de los efectos individuales (antagonismo).

Por último, al igual que Weiss et al. (2006), en este ensayo se encontró que los niveles de MP acumulados en las plantas cultivadas bajo sistema hidropónico fueron mayores con respecto a las plantas cultivadas en suelo. Estas diferencias estuvieron entre 98 - 99% para el Cu (en raíz y tallo+hojas), entre 92 - 97% para el Zn (raíz y tallo+hojas), y entre 63 - 99% para el Cr (raíz y tallo+hojas). Además, el efecto de los MP sobre las plantas bajo hidroponía fue mayor que en suelo, ya que la reducción de su biomasa total fue en menor tiempo por la incorporación de estos. La explicación que mejor se ajustaría a estos resultados es que comparado con el suelo que tiene la capacidad de amortiguar los efectos de los metales, bajo cultivo de hidroponía existe mayor biodisponibilidad de MP por lo tanto los efectos observados sobre la biomasa vegetal fue mayor; evidenciando en forma inmediata los efectos de las interacciones entre metales (Gilsanz 2007).



### 3.5. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en ambos experimentos, se pudo concluir que la absorción de cada metal, los factores de translocación y bioconcentración, y la biomasa total fueron afectadas por la combinación de metales, evidenciando la existencia de interacciones entre ellos. La incorporación al suelo de Cu/Zn y a altas concentraciones provocó que su disponibilidad aumentara, siendo más absorbidos por las plantas. Sin embargo, las raíces de *Sesbania virgata* tuvieron un importante rol en la retención de los metales, previniendo la acumulación tóxica y excesiva en la parte aérea de la planta. Asimismo, la mezcla binaria de estos dos metales a altas concentraciones, resultó en una máxima reducción de la biomasa total de *S. virgata*, evidenciando efectos sinérgicos entre ellos. En comparación con el cultivo en suelo, se observó mayor concentración de los tres metales bajo sistema de hidroponía tanto en raíz como en tallo+hojas, superando el 90% en la mayoría de los casos. Asimismo, en todos los tratamientos, las plantas acumularon altas concentraciones de MP en tallo+hojas. Por otro lado, la mezcla binaria de metales también generó una reducción significativa de la biomasa total de *S. virgata* con respecto a la presencia individual de cada metal. En función a los resultados obtenidos en ambos experimentos, se pudo concluir que *S. virgata* posee la capacidad de tolerar y estabilizar altas concentraciones de Cu, Zn y Cr en suelos, así como de tolerar y acumularlos en cultivo hidropónico, por lo que la especie podría considerarse capaz de remediar suelos y medios acuosos contaminados con MP.

El experimento bajo hidroponía permitió observar los efectos de las interacciones de MP sin el efecto amortiguador del suelo, indicando que la matriz de suelo ejerce un rol importante en la retención de los mismos. En tal sentido, bajo cultivo hidropónico, *S. virgata* absorbió mayor cantidad de MP en mezcla binaria, por lo que su biomasa total se vio más afectada. El suelo permitió que la planta absorbiera menor cantidad de metales, los translocara en menor cantidad a los órganos aéreos, y de esta manera afectara en menor proporción el crecimiento de la planta. En tal sentido, el conocimiento de la distribución de MP en la planta permite una mejor planificación para el potencial uso de esta especie como fitorremediadora para distintos sistemas, así como el riesgo que representan para el medio ambiente y la cadena trófica. Por eso, en base al experimento en suelo, y en función de su capacidad de absorción, se propone utilizar plantas de *Sesbania virgata* para la fitoestabilización de metales en suelos contaminados. Aunque en función a los resultados obtenidos en el ensayo complementario de hidroponía, esta especie también podría ser utilizada para la fitoextracción de metales en medios acuosos.

En función a los datos obtenidos acerca de los efectos de las mezclas binarias de cobre, cinc y cromo, podrían ser reevaluados los límites máximos permisibles en suelos para uso agrícola (Ley N° 24.051, Anexo 9), debido principalmente a que los mismos se sustentan en valores obtenidos con un MP individual y no contempla combinaciones de ellos.



Esquema 3.5: Esquema resumen del rechazo o no rechazo de las hipótesis planteadas al inicio del capítulo.

## **Parte B: Estrategias químicas y biológicas de remediación.**

### **Capítulo 4. Fitorremediación asistida<sup>□</sup>**

---

<sup>□</sup> Parte de este capítulo ha sido publicado

Branzini, A. y Zubillaga, M.S. 2012. Comparative use of soil organic and inorganic amendments in heavy metals stabilization. Applied and Environmental Soil Science. ISSN: 1687-7667.

## 4.1. INTRODUCCION

### 4.1.a. Estrategias de Remediación

#### 4.1.a.1. Estrategias químicas: Enmiendas inorgánica y orgánica.

La distribución de los MP en las distintas fracciones del suelo contaminado está determinada por las diferentes reacciones químicas y/o biológicas que ocurren en el mismo. Mediante reacciones de sorción, precipitación y complejación, el suelo retiene a los metales, reduciendo de esta manera, tanto su movilidad como su disponibilidad (Perez de Mora et al. 2005). Sin embargo, estos procesos de atenuación natural ocurridos en los suelos contaminados pueden ser complementados mediante la utilización *in situ* de tecnologías químicas, como la aplicación de enmiendas orgánicas e inorgánicas (Mench et al. 2006). La inmovilización química *in situ* es una estrategia de remediación con baja relación costo-efectividad, la cual estabiliza los MP en el suelo contaminado al minimizar sus formas móviles, mediante procesos que incluyen la adsorción en la superficie de minerales, la formación de complejos estables con ligandos orgánicos, precipitación e intercambio iónico (Kumpiene et al. 2008; Shulka et al. 2009; Cao et al. 2009). Generalmente, además de reducir la disponibilidad de los MP, estas técnicas de bajo costo, mejoran la fertilidad física, química y biológica del suelo e incrementan el desarrollo vegetal (Mench et al. 2003; Calace et al. 2005; Clemente et al., 2006). Por un lado, dentro de las enmiendas inorgánicas se encuentran los fertilizantes fosfatados (Wang et al. 2008) y las enmiendas calcáreas (Chaney et al. 1997; Zubillaga et al. 2006); y por el otro, dentro de las orgánicas, los compost de diversos orígenes (Basta et al. 2001).

#### *Enmienda inorgánica: Fertilizante fosfatado*

Los MP catiónicos pueden unirse a los elementos con carga superficial negativa por intercambio iónico (Srivastava et al. 2005), y en particular, la unión de los MP a compuestos fosfatados pueden formar precipitados metal-fosfatos, que reducen su solubilidad (Chen et al. 1997; Zhang y Ryan 1999).

Las fuentes de fosfato pueden incorporarse a los suelos, en su forma soluble como fosfatos de amonio o como superfosfato triple (Hettiarachchi et al. 2001; Bolan et al. 2003). Si bien al incorporar fertilizante fosfatado se produce disminución del pH alrededor del granulo del fertilizante, por la producción de ácido fosfórico, el efecto más predominante es la generación de compuestos poco solubles (Bolan et al. 2003; Adriano et al. 2004). Diversos autores demostraron que la adición de fuentes fosfatadas con mayor solubilidad que la roca fosfórica son eficientes en la reducción de solubilidad de metales (Maenpaa et al. 2002; Saxena y D'Souza 2006). Esta inmovilización puede resultar de diferentes procesos; siendo la precipitación uno de los principales en suelos altamente contaminados (Laperche y Traina 1998; McGowen et al. 2001). Según Wright et al. (2004) cuando se aplican fertilizantes fosfatados solubles en suelos contaminados, la inmovilización de MP se logra por la formación de minerales MP-fosfato estables. Los mismos resultados fueron encontrados en Australia por Bolan et al. (2003), quienes afirmaron que la precipitación de Pb y Zn con compuestos fosfatados, es el principal mecanismo por el cual se inmovilizan estos MP. Consecuentemente, los compuestos fosfatados pueden mantener la baja movilidad de los MP en el suelo por quimiosorción (Kumpiene et al. 2008).

Cabe destacar, que la formación de compuestos metálicos insolubles, lograría la reducción de su movilidad a través del perfil del suelo, disminuyendo su transporte y

por lo tanto minimizando el riesgo de alcanzar cuerpos de agua (Basta et al. 2001). Asimismo, el efecto final de estos procesos es la disminución del pool disponible para la biota, y la inhibición de la absorción vegetal (Geebelen et al. 2003; Adriano et al. 2004). En relación a esto último, Chen et al. (2007) encontraron que la adición de superfosfato triple al suelo reduce la cantidad de Cd y Zn absorbida por las raíces de la planta en un 31.2 y 47 %, respectivamente. Los mismos autores evidenciaron, a través de extracciones secuenciales, que la aplicación de enmiendas fosfatadas favorece el incremento de fracciones residuales de MP en detrimento de las de mayor disponibilidad.

#### *Enmienda orgánica: Compost de biosólido*

La transformación de residuos potencialmente peligrosos en un recurso agronómico y ambientalmente valioso a través del compostaje <sup>(3)</sup>, incrementó significativamente durante las últimas décadas. La valorización del residuo se evidencia al aplicar el compost <sup>(4)</sup> al suelo, ya que le otorga la capacidad de recuperar la calidad y cantidad de materia orgánica (valor como enmienda), y el contenido de nutrientes (valor como fertilizante) (Laos 2003). Una característica importante del proceso de compostaje es que debido a las temperaturas termófilas generadas, se suprimen organismos patógenos (Mazzarino y Laos 2000), y se obtiene un producto estable, libre de olores desagradables (Laos et al. 2002; Mazzarino et al. 2012). En general, al ser un producto estable, su uso para la remediación de suelos presenta ventajas respecto de la aplicación de residuos sin compostar (Wang et al. 1997; McBride 1997; Zubillaga et al. 2006).

Dentro de los residuos orgánicos con alto potencial de valorización tanto agrícola como ambiental, se encuentra el biosólido. La incorporación de biosólidos compostados podría evitar el incremento inicial en la biodisponibilidad de MP en suelos contaminados ya que la materia orgánica estable que lo compone podría generar mecanismos de adsorción específica y no-específica (Bolan y Duraisamy 2003; Basta et al. 2005). Esta materia orgánica estable es capaz de enlazar fuertemente iones metálicos siendo, esta unión, resultado de la formación de complejos que involucran varios grupos funcionales (carboxílos, hidroxílos) presentes en la materia orgánica en general y de sustancias húmicas y fúlvicas en particular (O'Dell et al. 2007).

En particular, la disminución en la biodisponibilidad de MP, podría atribuirse a la formación de quelatos de alto peso molecular con los constituyentes orgánicos de las enmiendas (Adriano 2001).

#### *4.1.a.2. Estrategias biológicas: Fitorremediación con Sesbania.*

Las técnicas biológicas o ecológicas de remediación promueven los procesos naturales y el desarrollo de técnicas para acelerar estos procesos en la recuperación de suelos contaminados, por lo que pueden considerarse procesos sostenibles (Bernal et al. 2007). En particular, el uso de productores primarios (fitorremediación) supone una estrategia de mitigación que incluye la detoxificación y estabilización tanto de sustancias orgánicas como de inorgánicas (Wei et al. 2007). Este concepto queda

<sup>3</sup> Compostaje: proceso biooxidativo que asegura la reducción de patógenos, elimina olores desagradables y estabiliza el material. Este proceso involucra un sustrato orgánico heterogéneo en estado sólido, el cual atraviesa una etapa termofílica y produce CO<sub>2</sub> y agua, minerales y materia orgánica estabilizada.

<sup>4</sup> Compost: producto derivado del proceso de compostaje. Materia orgánica estabilizada luego de ser sometida a una sucesión biológica degradativa llevada a cabo por microrganismos aeróbicos.

ilustrado en el trabajo realizado por Mills et al. (2006), quienes demostraron que el cultivo de plantas leñosas puede ser una herramienta eficiente para la extracción o estabilización de MP en suelos contaminados, evitando también la migración de los contaminantes. También, la fitorremediación puede ser usada para restablecer la comunidad vegetal en sitios con altos niveles de contaminación con MP, ya que una vez que la comunidad de plantas tolerantes se ha establecido, se reduce el potencial degradación física. Como se nombró en el Capítulo 3, la fitoestabilización es muy efectiva para inmovilizar o inactivar los contaminantes en el suelo, previniendo la migración de los contaminantes hacia aguas subterráneas o aire, y reduce la posibilidad de entrar a la cadena trófica (Raskin y Ensley 2000; USEPA 2000; Jadia y Fulekar 2009). En tal sentido, también es importante aclarar que la absorción y acumulación de MP en los órganos de las plantas dependen de diversos factores, los cuales incluyen a la temperatura, textura del suelo, materia orgánica, pH y disponibilidad de elementos químicos, así como de los requerimientos fisiológicos de las plantas (Cobbett y Goldsbrough 2002; Kumar Sharma et al. 2007).

El uso de plantas nativas, pueden superar competitivamente a las exóticas, alcanzando el equilibrio del ecosistema (Lasat 2002). Como se mencionó en el Capítulo 2, diferentes estudios demostraron que las especies del género *Sesbania* son tolerantes a las condiciones tóxicas generadas por la presencia de MP, pudiendo crecer y desarrollarse en dichos sitios (Wong et al. 1992; Ye et al. 2001; Chan et al. 2003; Sahi et al. 2007). Si bien numerosos estudios indicaron la tolerancia de distintas especies de *Sesbania* a altas concentraciones de MP, la capacidad remediadora de *Sesbania virgata* y *Sesbania punicea* es un interrogante.

#### 4.1.a.3. Combinación de estrategias: enmiendas - planta remediadora.

La combinación de estrategias de remediación puede ofrecer un gran potencial para mitigar los efectos de la contaminación de suelos (Mitton et al. 2012). La aplicación conjunta de enmiendas facilita el establecimiento de las plantas y la actividad de la microfauna del suelo degradado, favoreciendo la revegetación de zonas contaminadas (Yang et al. 2003; Madejón et al. 2006; Gupta et al. 2011). La aplicación del compost y del fertilizante fosfatado, podría reducir a su vez, la acumulación de los MP en los tejidos de las plantas, ya que disminuiría la biodisponibilidad de los mismos (Ye et al. 2001). En un estudio realizado en China, puede corroborarse lo antedicho, ya que se demostró que enmiendas orgánicas en combinación con fertilizantes inorgánicos aumentaron significativamente el crecimiento y la nodulación de distintas especies de *Sesbania*, estando esto determinado por una disminución en la fitotoxicidad (Yang et al. 2003). Por eso, según lo expuesto hasta aquí, la aplicación de estrategias químicas mejoraría el establecimiento y la performance de las especies vegetales remediadoras.

#### 4.1.b. Especiación de MP

En general, los MP incorporados al suelo por actividades antrópicas se acumulan en el horizonte superficial, pudiendo competir unos con otros por los sitios de adsorción (Serrano et al. 2005). Esta competencia y su comportamiento en el medio ambiente puede estar considerablemente influenciado por su especiación química (Sipos et al. 2008). En tal sentido, la especiación de MP controla su movilidad, biodisponibilidad y toxicidad bajo ciertas condiciones medioambientales (Ronkart et al. 2007). A su vez, la materia orgánica, las arcillas y los óxidos de Fe y Mn también son componentes

importantes en determinar la adsorción y desorción de los mismos en el suelo (Vega et al. 2006). Por eso, dependiendo de las características del suelo que conducen la especiación, los MP pueden ser retenidos en diferentes fracciones de la matriz del suelo, como intercambiables en arcillas minerales, unidos a óxidos de hierro y manganeso, unidos a carbonatos y/o adsorbidos a la materia orgánica del suelo (Boruvka y Drabek 2004).

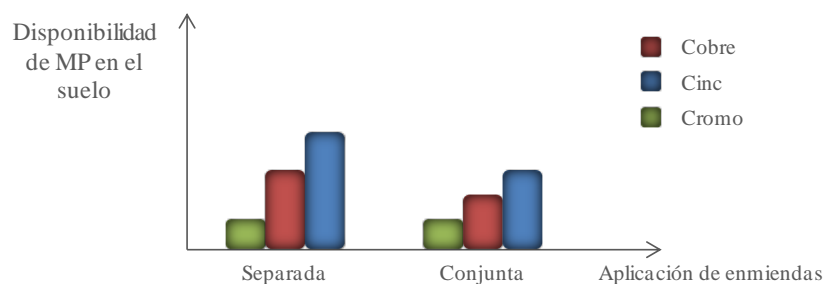
En consideración a lo descripto precedentemente, en estudios de remediación de suelos contaminados, importa tanto la identificación de las formas químicas y su disponibilidad, como las concentraciones totales de MP. Esto es debido a que las fracciones solubles y disponibles representan los pooles de MP más factibles de ser lixiviadas en el perfil del suelo y/o absorbidas por la biota (Adriano 2001). De esta manera, el estudio de la especiación química y del comportamiento de MP en el suelo permitiría que la gestión y manejo del mismo sea más adecuada para su remediación. Por ejemplo, la aplicación de las estrategias de remediación nombradas en el apartado anterior, podrían modificar la especiación de MP hacia especies menos tóxicas y menos móviles para el ecosistema (Mench et al. 2006).

### Objetivos

1. Analizar la distribución de Cu, Zn y Cr en las fracciones de un suelo contaminado, luego de aplicar compost de biosólidos y/o fertilizante fosfatado.
2. Comparar la eficiencia de fitorremediación de dos plantas nativas de la Región Pampeana (*Sesbania punicea*, *Sesbania virgata*) en un suelo contaminado con Cu, Zn y Cr.
3. Estudiar el efecto de la aplicación conjunta de estrategias químicas (enmiendas) y biológicas (*Sesbania virgata* y *Sesbania punicea*) de remediación, en la distribución de Cu, Zn y Cr de un suelo contaminado. Asimismo, evaluar el efecto en las diferentes especies químicas de estos MP.

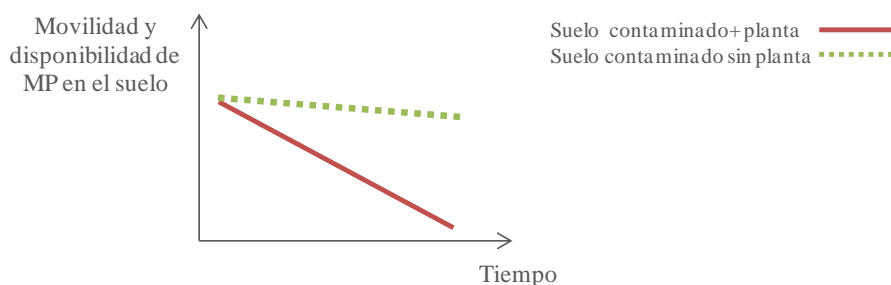
### Hipótesis

1. La incorporación de enmiendas orgánica e inorgánica en conjunto reducirá la biodisponibilidad de Cu, Zn y Cr, en mayor medida comparado con la aplicación por separado.



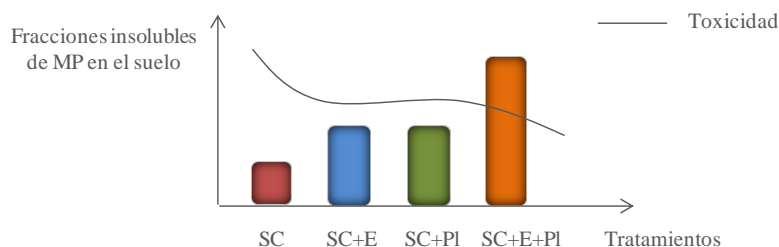
Esquema 4.1.1: Disponibilidad de MP en el suelo, en función a la aplicación de enmiendas orgánica e inorgánica, en forma separada y combinada.

- Las dos especies de *Sesbania* lograrán disminuir la movilidad y disponibilidad de los MP en el suelo.



Esquema 4.1.2: Movilidad y disponibilidad de MP en el suelo, en función al tiempo de implantación de especies vegetales.

- La aplicación conjunta de las prácticas remediadoras incrementará los efectos de estabilización, disminuyendo las fracciones más móviles, disponibles y tóxicas de MP (soluble y ligado a materia orgánica); e incrementando las fracciones más insolubles (precipitados con carbonatos).



Esquema 4.1.3: Fracciones insolubles de MP en el suelo en función de los tratamientos. SC= suelo contaminado con MP, SC+E= suelo contaminado + enmienda, SC+PI= suelo contaminado + planta, SC+E+PI= suelo contaminado + enmienda+planta.



## 4.2. MATERIALES Y METODOS

En este experimento, se utilizaron muestras de un suelo Hapludol típico, representativo de la Pampa Arenosa (35°37' S, 61°22' O) (Cuadro 4.2.1, Cuadro 4.2.3). Cinco muestras compuestas (equivalente a 10 kg cada una) de los primeros 20 cm del suelo fueron colectadas al azar (10 muestras individuales) dentro de un área homogénea de 4 ha. El suelo muestreado fue secado a temperatura ambiente y tamizado a fin de obtener tamaños de partícula y agregados de 2 mm de diámetro. Las muestras de suelo fueron contaminadas artificialmente agregando soluciones metálicas ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{H}_2\text{CrO}_4$ ), logrando concentraciones finales de  $350 \text{ mg kg}^{-1}$  de cobre (Cu),  $700 \text{ mg kg}^{-1}$  de cinc (Zn), y  $750 \text{ mg kg}^{-1}$  de cromo (Cr). Este enriquecimiento superó los niveles máximos de MP totales, permitidos para suelos agrícolas según lo establecido en la legislación nacional (Cuadro 3.2.2). A fin de lograr el equilibrio con la fracción coloidal del suelo, se realizaron ciclos de humedecimiento (a capacidad de campo) y secado cada cinco días, durante un período de 3 meses.

Cuadro 4.2.1: Características físico-químicas del suelo Hapludol típico utilizado en este experimento. Todos los datos están expresados en base seca (MS).

Arcilla	Limo	Arena	Textura	CIC	pH	CE	MO <sub>total</sub>	C <sub>soluble</sub>	N <sub>total</sub>
	%			cmol <sup>+</sup> kg <sup>-1</sup>	1:2.5; H <sub>2</sub> O	dS m <sup>-1</sup>		%	g kg suelo <sup>-1</sup>
17.4	24.1	58.5	Arenosa	21.1	5.37	0.47	1.81	1.33	2.1

MO<sub>total</sub> = materia orgánica total; C<sub>soluble</sub> = carbono soluble; N<sub>total</sub> = nitrógeno total

### 4.2.a. Experimento en invernáculo

El experimento fue llevado a cabo en macetas de 1000 g, en las cuales se colocó suelo contaminado con MP y se implementaron estrategias de remediación. Estas estrategias incluyeron la utilización de compost de biosólido (CB) como enmienda orgánica (Cuadro 4.2.a.1 y Cuadro 4.2.a.2), y superfosfato triple (FF) como enmienda inorgánica (dosis equivalente:  $100 \text{ Mg ha}^{-1}$  y  $100 \text{ kg ha}^{-1}$ , respectivamente); así como el implante de las especies vegetales *Sesbania virgata* (Sv) y *Sesbania punicea* (Sp). Las muestras de suelo fueron mezcladas con las enmiendas, considerando los primeros 100 días como tiempo mínimo para la estabilización enmienda-suelo contaminado, y luego de ese tiempo se implantaron las especies vegetales resultando los siguientes tratamientos:

1. suelo contaminado con MP (SC), como control
1. SC + FF
2. SC + CB
3. SC + FF + CB
4. SC + Sv
5. SC + Sv + FF
6. SC + Sv + CB

7. **SC + Sv + CB + FF**
8. **SC + Sp**
9. **SC + Sp + FF**
10. **SC + Sp + CB**
11. **SC + Sp + CB + FF**

El experimento fue realizado bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. De cada uno de los tratamientos y sus cuatro repeticiones, se realizaron muestreos destructivos en dos momentos del experimento: al inicio (0 días) y a los 190 días de la aplicación de las enmiendas y de la implantación de las especies vegetales.

Cuadro 4.2.a.1: Características físico-químicas del Compost de Biosólido utilizado en el experimento como enmienda orgánica (MS= materia seca).

<b>CIC</b>	<b>pH</b>	<b>CE</b>	<b>MO<sub>total</sub></b>	<b>C<sub>soluble</sub></b>	<b>N<sub>total</sub></b>	<b>C/N</b>
(cmolkg <sup>-1</sup> )	(1:2.5; H <sub>2</sub> O)	dS m <sup>-1</sup>	(%)		(g kg suelo <sup>-1</sup> )	
14,3	7,5	1,29	42,5	0,031	0,32	13,2

*MO<sub>total</sub> = materia orgánica total; C<sub>soluble</sub> = carbono soluble; N<sub>total</sub> = nitrógeno total; C/N = relación carbono-nitrógeno*

Cuadro 4.2.a.2: Contenidos de MP en el suelo Hapludol típico y en el compost de biosólido, y el máximo nivel de MP totales, establecidos por la reglamentación argentina (Ley de Residuos Peligrosos: Guía de Calidad de Suelo).

<b>Metales pesados (mg kg DM<sup>-1</sup>)</b>					
	Hapludol típico		Compost de biosólido		Ley N° 24.051*
	Disponible	Total	Disponible	Total	Total
Cu	0,051	17,0	1,52	726,7	150-500
Zn	0,040	38,2	0,65	1183,3	600-1500
Cr	<0,001	14,9	13,2	230,0	750

*\*Niveles para suelos con uso agrícola e industrial*

#### 4.2.b. Análisis químicos en suelo y planta

*Determinaciones en Suelo:* En cada momento de muestreo y para cada una de las macetas se realizó un procedimiento de extracción secuencial de Cu, Zn y Cr (3 g de suelo en tubos de centrifugación de polipropeno de 50 cm<sup>3</sup>), de acuerdo a la metodología desarrollada por Mc Grath y Cegarra (1992). Mediante este procedimiento se pudo separar a los metales en cuatro fracciones operacionalmente definidas: soluble e

intercambiable (EX), unidos a materia orgánica (OC), unidos a carbonatos (CR), y residual (RES) (Cuadro 4.2.b.1). Luego de cada extracción, la solución fue separada del sólido mediante centrifugación a 3000 rpm durante 45 minutos, y el sobrenadante se filtró con papel de filtro Whatman N° 42, pesando el residuo húmedo en el tubo. Este tipo de procedimiento se utilizó exitosamente en suelos tratados con biosólidos (Alva et al. 2000; Amir et al. 2005; Torri y Lavado 2008). Por otro lado, las concentraciones pseudototales de MP se determinaron mediante digestión ácida con mezcla de HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y HNO<sub>3</sub> (Mc Grath y Cunliffe 1985). Los contenidos de MP en cada sobrenadante se cuantificaron mediante espectrofotometría de absorción atómica (AAS). En cada momento de muestreo se determinó pH y conductividad eléctrica (CE) con electrodo de vidrio usando relación suelo agua destilada, 1: 2.5 m/v (Faithfull 2004).

Cuadro 4.2.b.1: Procedimiento de extracción secuencial de los MP presentes en las muestras de suelo y sus correspondientes fases.

Fase / asociación	Nom.	Paso	Procedimiento Operacional
Soluble – Intercambiable	EX	1	30 ml CaCl <sub>2</sub> , agitar 16 h a temperatura ambiente
Unido – Materia Orgánica	OC	2	30 ml NaOH, agitar 16 h a temperatura ambiente
Unido– Carbonatos	CR	3	30 ml Na <sub>2</sub> EDTA, agitar 1 h
Residual	RES	4	Estimado mediante la sumatoria de las tres fracciones anteriores y restado del contenido pseudototal

*Determinaciones en Planta:* Las muestras de material vegetal se lavaron con agua destilada para eliminar partículas de suelo y se secaron en estufa a 60 °C hasta peso constante, el cual se alcanzó a las 48 horas. La biomasa seca total (BST) se obtuvo al sumar el peso seco de tallo, raíz y hojas; y también se tomaron medidas de longitud de raíz y tallo (en cm), diámetro de tallo y cantidad de hojas. Posteriormente, se determinó la cantidad de Cu, Zn y Cr absorbidos por la planta (en biomasa total), para lo cual 1 g del material vegetal se molió en un mortero de porcelana y se realizó una digestión húmeda con mezcla de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) y ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>), en una relación 3:1 (v:v). Las determinaciones de Cu, Zn y Cr se realizaron con un espectrofotómetro de absorción atómica (AA Analyst Perkin-Elmer).

#### 4.2.c. Análisis de muestras con Microscopía de Transmisión Electrónica

Se realizó un estudio cualitativo, complementario a la extracción secuencial, utilizando microscopía y microanálisis de las muestras de suelo prístino, sin contaminar (SP), contaminado (SC) y luego de la aplicación de las estrategias de remediación (SC+FF+CB+Sv), con microscopio de transmisión electrónica, en el “Laboratoire Sols et Environnement”, del Institut National Polytechnique de Lorraine, el cual se encuentra en Nancy, Francia.

Las muestras de suelo fueron separadas en tres fracciones por decantación diferencial: fracción materia orgánica, fracción arcilla y fracción limo. Cada una de estas fracciones se fijó en 2.5% (m/v) glutaraldehído con buffer fosfato (pH = 7,2) durante 16 horas, y en 2% (m/v) tetróxido de osmio con buffer fosfato (pH = 7,2) por

una hora. Se deshidrataron gradualmente con acetona y se embebieron en resina epoxi (Epon 812). Utilizando un ultra-microtomo (Leica UltracutS) se cortaron secciones ultra-finas (80 nm) teniendo en cuenta la mayor porción de muestra. Estas secciones ultra-finas fueron teñidas con acetato de uranio (Valentine 1961) y citrato de plomo (Reynolds 1963) para luego ser examinadas con microscopio de transmisión electrónica (TEM-EDX, modelo Phillips CM 20), operado a un voltaje de 80kV (Imagen 4.2.d.1).

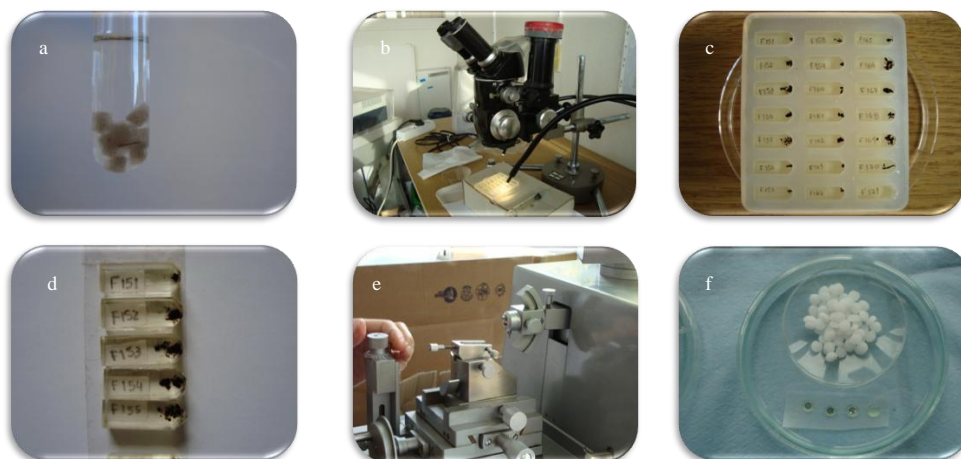


Imagen 4.2.d.1: a) Fracciones de suelo fijadas en glutaraldehído y en teróxido de osmio con buffer fosfato; b) ubicación de las fracciones fijadas en el molde con resina epoxi ; c) molde conteniendo fracción materia orgánica en resina epoxi; d) muestras en resina epoxi; e) ultramicrotomo; f) secciones ultrafinas con acetato de uranio y citrato de plomo.

El microanálisis de partículas seleccionadas (fracciones limo y materia orgánica) se realizó mediante espectroscopia de pérdida de energía de electrones (EELS). Los espectros de EEL se registraron por difracción en modo de acople, usando un espectrómetro paralelo Gatan 666, con energía de dispersión de 0.2 eV por canal sobre un área de 125 nm<sup>2</sup> (Imagen 4.2.d.2). Se analizaron los distintos componentes del suelo incluyendo los macro y microelementos unidos entre sí (C, N, O, Si, Ca, Na, Mg; y Fe, Cl, Ni, Cu, Zn y Cr), usando como blanco la refracción de la resina.

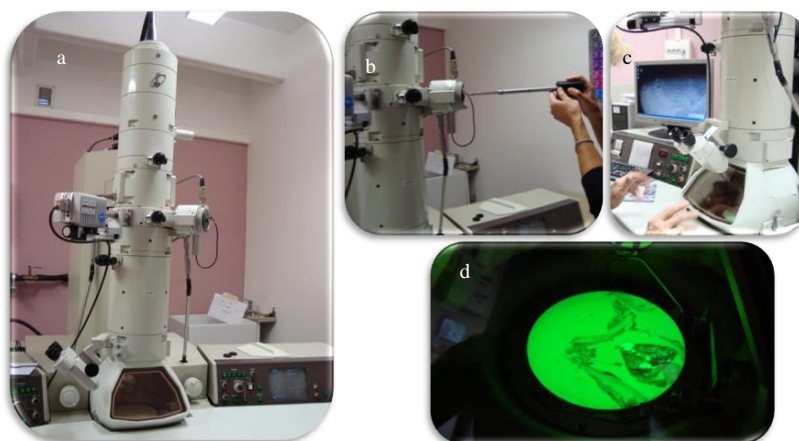


Imagen 4.2.d.2: a) Microscopio de transmisión electrónica; b) inyección de secciones ultrafinas; c) microanálisis de las muestras; d) imagen aumentada de las secciones ultrafinas.

#### 4.2.d. Análisis estadístico

Los efectos de los tratamientos fueron determinados mediante un arreglo factorial completo combinando 3 factores (enmiendas, especies de *Sesbania* y momentos de muestreo), de acuerdo al procedimiento de modelo general lineal del Statistics, versión 8.0. Se realizaron contrastes cuando las interacciones entre los factores fueron significativas. Las varianzas fueron estabilizadas cuando fue necesario mediante una transformación logarítmica del set de datos. Se realizaron correlaciones lineales simples entre las variables analizadas.

Cuadro 4.2.d.1: Diagrama del Arreglo factorial 4 x 3 x 2 de los tratamientos (enmiendas x plantas x momento)

Arreglo Factorial 2 x 5			Factor 1			
		Factor 3	Sin enmienda	Fertilizante fosfatado	Compost de biosólido	Fertilizante fosfatado + compost de biosólido
Factor 2	si	1	SC <sub>1</sub>	SC+FF <sub>1</sub>	SC+CB <sub>1</sub>	SC+CB+FF <sub>1</sub>
	n	2	SC <sub>2</sub>	SC+FF <sub>2</sub>	SC+CB <sub>2</sub>	SC+CB+FF <sub>2</sub>
	Sv	1	SC+Sv <sub>1</sub>	SC+Sv+FF <sub>1</sub>	SC+Sv+CB <sub>1</sub>	SC+Sv+CB+FF <sub>1</sub>
		2	SC+Sv <sub>2</sub>	SC+Sv+FF <sub>2</sub>	SC+Sv+CB <sub>2</sub>	SC+Sv+CB+FF <sub>2</sub>
	Sp	1	SC+Sp <sub>1</sub>	SC+Sp+FF <sub>1</sub>	SC+Sp+CB <sub>1</sub>	SC+Sp+CB+FF <sub>1</sub>
		2	SC+Sp <sub>2</sub>	SC+Sp+FF <sub>2</sub>	SC+Sp+CB <sub>2</sub>	SC+Sp+CB+FF <sub>2</sub>

### 4.3. RESULTADOS

#### 4.3.a. Efecto de las estrategias de remediación en la distribución de MP

La distribución de Cu, Zn y Cr en las diferentes fracciones del suelo contaminado y luego de la aplicación de estrategias de remediación, para ambos

momentos de muestreo, se presenta en el Cuadro 4.3.a.1. Según los valores obtenidos, la distribución de cada MP en el suelo contaminado siguió un patrón similar en el suelo remediado; de hecho, cada metal estudiado se asoció de manera diferente con los componentes del suelo.

Cuadro 4.3.a.1: Distribución de Cu, Zn y Cr en las fracciones soluble e intercambiable (EX), unidos a materia orgánica (OC), unidos a carbonatos (CR) y residual (RES) del suelo Hapludol típico: (i) Cu, ii) Zn, y iii) Cr; en dos momentos del ensayo: al inicio (a) y al final (b). Nivel de significancia  $p < 0,05$ ; NS= no significativo.

i	Cu	Concentración de metales pesados en las fracciones de suelo (mg kg <sup>-1</sup> )			
		EX	OC	CR	RES
	SC <sub>a</sub>	2,56 ± 0,8	183,27 ± 16,3	189,20 ± 12,6	29,25 ± 4,3
	SC <sub>b</sub>	4,25 ± 0,5	200,73 ± 7,2	183,97 ± 17,1	20,76 ± 3,2
	SC+FF <sub>a</sub>	4,70 ± 2,4	186,20 ± 12,6	183,90 ± 2,5	20,12 ± 14,4
	SC+FF <sub>b</sub>	5,14 ± 2,7	199,93 ± 18,7	166,73 ± 10,8	39,52 ± 17,1
	SC+CB <sub>a</sub>	3,72 ± 0,3	196,93 ± 13,4	190,53 ± 11,6	47,12 ± 3,1
	SC+CB <sub>b</sub>	3,75 ± 1,0	206,30 ± 16,3	150,85 ± 11,6	50,18 ± 0,8
	SC+FF+CB <sub>a</sub>	4,76 ± 0,7	202,00 ± 10,1	187,20 ± 9,8	31,20 ± 9,5
	SC+FF+CB <sub>b</sub>	4,95 ± 0,4	189,80 ± 3,7	162,30 ± 8,9	45,67 ± 4,3
	SC+Sv <sub>a</sub>	4,22 ± 1,3	207,63 ± 3,2	185,70 ± 4,4	27,61 ± 1,5
	SC+Sv <sub>b</sub>	4,20 ± 1,3	190,10 ± 12,1	194,90 ± 32,6	23,05 ± 2,2
	SC+Sv+FF <sub>a</sub>	5,11 ± 1,6	139,55 ± 4,1	209,10 ± 21,5	13,47 ± 15,4
	SC+Sv+FF <sub>b</sub>	6,60 ± 0,4	185,07 ± 4,9	195,72 ± 10,2	43,05 ± 18,1
	SC+Sv+CB <sub>a</sub>	4,41 ± 0,4	200,10 ± 8,8	176,07 ± 7,2	18,54 ± 5,1
	SC+Sv+CB <sub>b</sub>	3,56 ± 0,6	188,50 ± 10,4	189,15 ± 18,7	39,16 ± 1,0
	SC+Sv+CB+FF <sub>a</sub>	4,77 ± 0,7	195,00 ± 4,3	178,10 ± 7,5	5,65 ± 2,5
	SC+Sv+CB+FF <sub>b</sub>	3,03 ± 0,3	208,83 ± 12,8	170,55 ± 24,8	11,24 ± 2,0
	SC+Sp <sub>a</sub>	4,18 ± 0,2	195,47 ± 9,2	184,17 ± 8,5	42,55 ± 11,5
	SC+Sp <sub>b</sub>	4,65 ± 0,5	190,10 ± 13,2	191,57 ± 1,5	17,27 ± 3,9
	SC+Sp+FF <sub>a</sub>	5,33 ± 0,5	144,88 ± 9,0	214,85 ± 15,0	23,78 ± 5,6
	SC+Sp+FF <sub>b</sub>	6,66 ± 0,9	167,80 ± 5,9	225,75 ± 48,9	52,87 ± 2,0
	SC+Sp+CB <sub>a</sub>	5,16 ± 0,4	153,10 ± 9,1	209,15 ± 10,7	37,66 ± 9,1
	SC+Sp+CB <sub>b</sub>	3,65 ± 0,4	192,20 ± 16,9	190,72 ± 26,9	59,74 ± 2,0
	SC+Sp+CB+FF <sub>a</sub>	5,18 ± 0,7	125,48 ± 7,2	234,52 ± 10,0	19,31 ± 5,0
	SC+Sp+CB+FF <sub>b</sub>	3,92 ± 0,5	186,10 ± 9,9	186,00 ± 12,4	30,83 ± 0,7
ANOVA (valores de p)					
	Planta	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	Enmiendas	0,022	< 0,001	NS	< 0,001
	Momento	NS	0,033	0,007	< 0,001
	Enmiendas x Planta	0,049	0,019	NS	0,003
	Enmiendas x Momento	0,002	NS	NS	< 0,001
	Planta x Momento	NS	NS	NS	NS
	Enmienda x Planta x Momento	NS	0,002	NS	NS

SC= Suelo contaminado, FF= fertilizante fosfatado, CB= Compost de biosólido, Sv= Sesbania virgata, Sp=Sesbania punicea (Media ± S.D., n=3).

ii

Zn	Concentración de metales pesados en las fracciones de suelo (mg kg <sup>-1</sup> )			
	EX	OC	CR	RES
SC <sub>a</sub>	553,00 ± 42,6	195,17 ± 6,7	330,33 ± 29,5	10,30 ± 5,8
SC <sub>b</sub>	457,00 ± 47,6	115,73 ± 0,6	199,83 ± 19,3	30,20 ± 8,2
SC+FF <sub>a</sub>	569,33 ± 77,5	141,33 ± 25,0	340,67 ± 111,6	126,05 ± 0,5
SC+FF <sub>b</sub>	438,17 ± 77,9	110,80 ± 26,0	197,17 ± 29,5	28,52 ± 9,8
SC+CB <sub>a</sub>	547,67 ± 67,2	193,33 ± 63,1	334,00 ± 84,3	83,30 ± 28,3
SC+CB <sub>b</sub>	426,17 ± 68,0	140,20 ± 31,5	234,67 ± 26,3	59,82 ± 22,3
SC+FF+CB <sub>a</sub>	557,33 ± 19,0	172,50 ± 13,5	317,67 ± 9,7	19,55 ± 0,5
SC+FF+CB <sub>b</sub>	422,67 ± 23,1	126,20 ± 20,9	242,33 ± 44,7	123,59 ± 78,0
SC+Sv <sub>a</sub>	571,27 ± 34,6	150,50 ± 21,5	306,67 ± 19,9	25,05 ± 17,5
SC+Sv <sub>b</sub>	414,33 ± 46,3	99,07 ± 3,4	242,50 ± 1,0	121,54 ± 42,7
SC+Sv+FF <sub>a</sub>	469,50 ± 13,1	138,90 ± 20,1	269,83 ± 53,5	82,80 ± 10,3
SC+Sv+FF <sub>b</sub>	435,33 ± 22,3	69,27 ± 2,0	193,00 ± 10,3	168,39 ± 0,9
SC+Sv+CB <sub>a</sub>	556,33 ± 48,9	163,17 ± 22,2	324,00 ± 27,8	58,05 ± 28,0
SC+Sv+CB <sub>b</sub>	385,17 ± 50,5	106,67 ± 13,1	263,67 ± 25,1	163,34 ± 48,9
SC+Sv+CB+FF <sub>a</sub>	508,00 ± 30,5	146,67 ± 11,4	390,67 ± 37,6	51,05 ± 0,0
SC+Sv+CB+FF <sub>b</sub>	345,00 ± 21,2	132,53 ± 6,2	294,00 ± 15,8	46,47 ± 16,6
SC+Sp <sub>a</sub>	558,00 ± 12,5	137,67 ± 13,0	342,33 ± 109,9	58,05 ± 1,0
SC+Sp <sub>b</sub>	431,67 ± 21,4	90,67 ± 11,5	222,83 ± 6,3	11,67 ± 0,2
SC+Sp+FF <sub>a</sub>	515,17 ± 43,5	137,90 ± 24,2	287,67 ± 17,9	97,55 ± 45,5
SC+Sp+FF <sub>b</sub>	433,83 ± 10,3	72,07 ± 5,3	195,83 ± 29,2	158,09 ± 40,0
SC+Sp+CB <sub>a</sub>	515,83 ± 33,1	150,58 ± 17,4	298,00 ± 53,3	85,93 ± 6,6
SC+Sp+CB <sub>b</sub>	387,50 ± 13,6	118,73 ± 3,2	278,67 ± 20,7	29,17 ± 15,8
SC+Sp+CB+FF <sub>a</sub>	490,33 ± 27,9	129,72 ± 8,4	326,50 ± 42,1	62,05 ± 6,0
SC+Sp+CB+FF <sub>b</sub>	411,83 ± 28,8	126,60 ± 14,3	291,50 ± 34,5	22,84 ± 3,7
<b>ANOVA (valores de p)</b>				
Planta	0,035	<0,001	NS	<0,001
Enmiendas	0,012	<0,001	<0,001	<0,001
Momento	<0,0001	<0,001	<0,001	NS
Enmiendas x Planta	NS	NS	NS	0,002
Enmiendas x Momento	NS	0,034	NS	NS
Planta x Momento	NS	NS	NS	<0,001
Enmienda x Planta x Momento	NS	NS	NS	<0,001

SC= Suelo contaminado, FF= fertilizante fosfatado, CB= Compost de biosólido, Sv= Sesbania virgata, Sp=Sesbania punicea (Media ± S.D., n=3).

Cr	Concentración de metales pesados en las fracciones de suelo (mg kg <sup>-1</sup> )			
	EX	OC	CR	RES
SC <sub>a</sub>	0,27 ± 0,04	32,63 ± 6,6	139,47 ± 5,1	446,8 ± 1,7
SC <sub>b</sub>	0,54 ± 0,1	57,48 ± 2,9	152,13 ± 2,8	466,28 ± 4,5
SC+FF <sub>a</sub>	0,53 ± 0,01	32,20 ± 2,7	138,20 ± 9,0	469,5 ± 10,4
SC+FF <sub>b</sub>	0,63 ± 0,2	52,15 ± 10,6	143,83 ± 14,3	616,02 ± 25,0
SC+CB <sub>a</sub>	0,43 ± 0,03	34,20 ± 7,4	123,73 ± 14,6	476,3 ± 21,5
SC+CB <sub>b</sub>	0,50 ± 0,5	45,57 ± 6,9	145,95 ± 0,9	496,43 ± 7,1
SC+FF+CB <sub>a</sub>	0,62 ± 0,1	28,87 ± 2,8	115,93 ± 11,6	431,5 ± 10,4
SC+FF+CB <sub>b</sub>	0,79 ± 0,2	39,70 ± 0,8	143,47 ± 4,3	543,13 ± 4,2
SC+Sv <sub>a</sub>	0,49 ± 0,03	36,50 ± 3,2	128,00 ± 12,6	437,53 ± 10,8
SC+Sv <sub>b</sub>	0,59 ± 0,02	41,39 ± 7,8	188,48 ± 22,4	411,54 ± 29,5
SC+Sv+FF <sub>a</sub>	0,51 ± 0,01	34,35 ± 1,6	133,10 ± 9,8	453,52 ± 9,6
SC+Sv+FF <sub>b</sub>	0,57 ± 0,1	30,98 ± 2,7	167,53 ± 7,8	516,12 ± 10,4
SC+Sv+CB <sub>a</sub>	0,50 ± 0,02	29,60 ± 4,5	136,80 ± 1,6	443,96 ± 5,7
SC+Sv+CB <sub>b</sub>	0,50 ± 0,1	30,79 ± 0,8	165,43 ± 9,7	822,20 ± 9,4
SC+Sv+CB+FF <sub>a</sub>	0,65 ± 0,01	28,90 ± 2,4	129,60 ± 8,2	430,59 ± 9,4
SC+Sv+CB+FF <sub>b</sub>	0,49 ± 0,3	36,13 ± 3,7	164,77 ± 11,5	509,62 ± 14,1
SC+Sp <sub>a</sub>	0,59 ± 0,1	32,97 ± 1,3	134,93 ± 0,4	505,31 ± 1,8
SC+Sp <sub>b</sub>	0,71 ± 0,1	38,63 ± 5,2	155,15 ± 15,4	497,19 ± 20,7
SC+Sp+FF <sub>a</sub>	0,56 ± 0,04	32,58 ± 0,8	136,57 ± 4,5	487,41 ± 5,1
SC+Sp+FF <sub>b</sub>	0,46 ± 0,2	27,82 ± 2,5	174,72 ± 16,6	490,36 ± 15,0
SC+Sp+CB <sub>a</sub>	0,51 ± 0,1	33,58 ± 3,2	129,33 ± 7,1	490,81 ± 9,9
SC+Sp+CB <sub>b</sub>	0,44 ± 0,01	33,14 ± 3,3	164,80 ± 15,3	538,65 ± 15,1
SC+Sp+CB+FF <sub>a</sub>	0,61 ± 0,1	30,92 ± 2,0	125,43 ± 5,6	468,43 ± 4,6
SC+Sp+CB+FF <sub>b</sub>	0,58 ± 0,2	30,08 ± 5,4	171,20 ± 10,3	563,50 ± 15,3
ANOVA (valores de p)				
Planta	<0,001	<0,001	0,002	<0,001
Enmiendas	NS	<0,001	NS	<0,001
Momento	NS	<0,001	<0,001	<0,001
Enmiendas x Planta	NS	NS	NS	<0,001
Enmiendas x Momento	NS	0,025	NS	<0,001
Planta x Momento	NS	<0,001	0,002	<0,001
Enmienda x Planta x Momento	NS	NS	NS	<0,001

SC= Suelo contaminado, FF= fertilizante fosfatado, CB= Compost de biosólido, Sv= *Sesbania virgata*, Sp=*Sesbania punicea* (Media ± S.D., n=3).

Las mayores concentraciones de Cu se observaron en la fracción orgánica del suelo y en la fracción unida a carbonatos (Cuadro 4.3.a.1, (i-OC y CR)). En general, la asociación del Cu con la materia orgánica del suelo, fue mayor al final del ensayo de invernáculo, exceptuando los tratamientos con implantación de las especies de *Sesbania* (SC+Sp y SC+Sv) y con aplicación de ambas enmiendas en conjunto (SC+CB+FF) (Cuadro 4.3.a.1 (i)). Según los contrastes realizados, la aplicación individual de compost de biosólido aumentó significativamente el contenido orgánico de Cu, al final del ensayo comparado con el inicio del mismo (Cuadro 4.3.a.2 (contraste 1)). Consecuentemente, se observó que al final del ensayo el Cu soluble fue menor y el residual fue mayor para los tratamientos con aplicación de CB (Cuadro 4.3.a.1 (i-RES)). Específicamente, en el Cuadro 4.3.a.2 (contraste 2) se muestra que la máxima reducción del Cu soluble resultó con la combinación del compost, el fertilizante y la especie *S. virgata*, y que se incrementó la concentración de Cu unido a materia orgánica.



Cuadro 4.3.a.2: Resultados de los contrastes entre los tratamientos para probar la concentración de Cu en la fracción extractable con NaOH, en función de la implantación de especies de *Sesbania*, aplicación de enmiendas y momentos de muestreo. (a) momento inicial, (b) momento final.

CONTRASTES	Metales pesados extraídos con NaOH (mg kg <sup>-1</sup> )
	Cu
<b>1. Momento vs Enmienda</b> (SC+CB & SC+Sp+CB & SC+Sv+CB) <sub>a</sub> vs (SC+CB & SC+Sp+CB & SC+Sv+CB) <sub>b</sub>	<0,001
<b>2. Enmienda vs Planta</b> (SC+Sv+CB & SC+Sv+CB+FF) vs (SC+Sv & SC+Sv+FF)	0,013

Nivel de Significancia  $p < 0,05$ ; NS = no significativo

Asimismo, un alto contenido de Cu se encontró unido a carbonatos (Cuadro 4.3.a.1 (i-CR)). En la misma se observa que existieron efectos individuales de los factores momento y planta, mostrando que la concentración de Cu extractado con EDTA disminuyó con el tiempo del ensayo y que en los tratamientos fitorremediados incrementó el contenido de Cu en la misma fracción.

El Zn fue el elemento más lábil, ya que se observó mayor concentración del mismo en la primer fase de extracción, la soluble e intercambiable (Cuadro 4.3.a.1 (ii-EX)). Según se observa en el Cuadro, no hubo efecto de interacción entre factores, por lo que existieron efectos individuales de cada uno de ellos. En tal sentido, se observó que la solubilidad de Zn se redujo con el tiempo del ensayo para todos los tratamientos (Cuadro 4.3.a.1 (ii-EX)). Asimismo, la implantación de ambas especies de *Sesbania*, también disminuyó la solubilidad de Zn en ambos momentos de muestreo, sin evidenciar diferencia entre especies (Cuadro 4.3.a.3 (contraste 1)). Sin embargo, cabe destacar, que la combinación de compost de biosólido, con el fertilizante fosfatado y la especie *S. virgata* redujo la solubilidad del Zn en un 25% (Cuadro 4.3.a.1 (ii-EX)). Si bien al inicio del ensayo, la aplicación de fertilizante (SC+FF) incrementó la solubilidad del Zn, al final del ensayo, la aplicación de CB logró reducirla en un 10% (Cuadro 4.3.a.3 (contraste 2)).

Cuadro 4.3.a.3: Resultados de los contrastes entre los tratamientos para probar la concentración de Zn en la fracción extractable con CaCl<sub>2</sub>, en función de la implantación de especies de *Sesbania*, aplicación de enmiendas y momentos de muestreo. (a) momento inicial, (b) momento final.

CONTRASTES	Metales pesados extraídos con CaCl <sub>2</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )
	Zn
<b>1. Planta vs Momento</b> (SC & SC+FF & SC+CB & SC+CB+FF) <sub>a</sub> vs (SC+Sp & SC+Sp+FF & SC+Sp+CB & SC+Sp+CB+FF & SC+Sv & SC+Sv+FF & SC+Sv+CB & SC+Sv+CB+FF) <sub>a</sub> (SC & SC+FF & SC+CB & SC+CB+FF) <sub>b</sub> vs (SC+Sp & SC+Sp+FF & SC+Sp+CB & SC+Sp+CB+FF & SC+Sv & SC+Sv+FF & SC+Sv+CB & SC+Sv+CB+FF) <sub>b</sub>	<0,001 0,005
<b>1. Enmienda vs Momento</b> (SC & SC+FF & SC+Sp & SC+Sp+FF & SC+Sv & SC+Sv+FF) <sub>b</sub> vs (SC+CB & SC+CB+FF & SC+Sp+CB & SC+Sp+CB+FF & SC+Sv+CB & SC+Sv+CB+FF) <sub>b</sub> (SC & SC+CB & SC+Sp & SC+Sp+CB & SC+Sv & SC+Sv+CB) <sub>a</sub> vs (SC+FF & SC+CB+FF & SC+Sp+FF & SC+Sp+CB+FF & SC+Sv+FF & SC+Sv+CB+FF) <sub>a</sub>	<0,001 0,004

Nivel de Significancia  $p < 0,05$ ; NS = no significativo

Además de encontrarse en mayor proporción lábil, también se encontró una elevada concentración de Zn unido a la fracción carbonatos (Cuadro 4.3.a.1 (ii-CR)). En general, al final del ensayo, en los tratamientos con aplicación de CB, el contenido de Zn en la fracción unida a carbonatos incrementó con respecto al inicio (Cuadro 4.3.a.4).

Cuadro 4.3.a.4: Resultados de los contrastes entre los tratamientos para probar la concentración de Zn en la fracción extractable con EDTA, en función de la implantación de especies de *Sesbania*, aplicación de enmiendas y momentos de muestreo. (a) momento inicial, (b) momento final.

CONTRASTES	Metales pesados extraídos con EDTA (mg kg <sup>-1</sup> )
	Zn
<b>1. Enmienda vs Momento</b>	
(SC & SC+FF & SC+Sp & SC+Sp+FF & SC+Sv & SC+Sv+FF) <sub>a</sub> vs (SC+CB & SC+CB+FF & SC+Sp+CB & SC+Sp+CB+FF & SC+Sv+CB & SC+Sv+CB+FF) <sub>a</sub>	0,045
(SC & SC+FF & SC+Sp & SC+Sp+FF & SC+Sv & SC+Sv+FF) <sub>b</sub> vs (SC+CB & SC+CB+FF & SC+Sp+CB & SC+Sp+CB+FF & SC+Sv+CB & SC+Sv+CB+FF) <sub>b</sub>	<0,001

Nivel de Significancia  $p < 0,05$ ; NS= no significativo

Por último, la mayor concentración de Cr, se observó en la fracción residual, seguida por la fracción unida a carbonatos (Cuadro 4.3.a.1 (iii-RES y iii-CR)). Por un lado, el contenido de Cr residual se incrementó al final del ensayo, y la aplicación de individual de enmiendas favoreció ese incremento (Cuadro 4.3.a.5).

Cuadro 4.3.a.5: Resultados de los contrastes entre los tratamientos para probar la concentración de Cr en la fracción residual, en función de la implantación de especies de *Sesbania*, aplicación de enmiendas y momentos de muestreo. (a) momento inicial, (b) momento final.

CONTRASTES	Metales pesados residuales (mg kg <sup>-1</sup> )
	Cr
<b>1. Enmiendas vs Momento</b>	
(SC & SC+Sp & SC+Sv) <sub>b</sub> vs (SC+FF & SC+CB & SC+CB+FF & SC+Sp+FF & SC+Sp+CB & SC+Sp+CB+FF & SC+Sv & SC+Sv+FF & SC+Sv+CB & SC+Sv+CB+FF) <sub>b</sub>	<0,001
(SC & SC+FF & SC+Sp & SC+Sp+FF & SC+Sv & SC+Sv+FF) vs (SC+CB & SC+CB+FF & SC+Sp+CB & SC+Sp+CB+FF & SC+Sv+CB & SC+Sv+CB+FF)	0,004 (a)
(SC & SC+FF & SC+CB & SC+Sp & SC+Sp+FF & SC+Sp+CB & SC+Sv & SC+Sv+FF & SC+Sv+CB) vs (SC+CB+FF & SC+Sp+CB+FF & SC+Sv+CB+FF)	<0,001 (a)
	<0,001 (b)

Nivel de Significancia  $p < 0,05$ ; NS= no significativo

Al final del ensayo, también se incrementó el contenido de Cr unido a la fracción de carbonatos en todos los tratamientos, con respecto al inicio, principalmente con fitorremediación (Cuadro 4.3.a.6 (contraste 1)).

Cuadro 4.3.a.6: Resultados de los contrastes entre los tratamientos para probar la concentración de Cr en la fracción extractable con EDTA, en función de la implantación de especies de *Sesbania*, aplicación de enmiendas y momentos de muestreo. (a) momento inicial, (b) momento final.

CONTRASTES	Metales pesados extraídos con EDTA (mg kg <sup>-1</sup> )
	Cr
<b>1. Planta vs Momento</b>	
(SC & SC+FF & SC+CB & SC+CB+FF) <sub>b</sub> vs (SC+Sp & SC+Sp+FF & SC+Sp+CB & SC+Sp+CB+FF & SC+Sv & SC+Sv+FF & SC+Sv+CB & SC+Sv+CB+FF) <sub>b</sub>	<0,001
<b>2. Enmienda vs Momento</b>	
(SC+FF & SC+Sp+FF & SC+Sv+FF) <sub>a</sub> vs (SC+CB & SC+CB+FF & SC+Sp & SC+Sp+CB & SC+Sp+CB+FF & SC+Sv & SC+Sv+CB & SC+Sv+CB+FF) <sub>a</sub>	0,038

Nivel de Significancia  $p < 0,05$ ; NS= no significativo

Cabe aclarar, que si bien el agregado individual de FF al suelo contaminado, incrementó inicialmente el Cr unido a la fracción carbonatos, al final del ensayo esa relación se revirtió, siendo menor con respecto a los tratamientos sin aplicación de FF (Cuadro 4.3.a.6 (contraste 2)).

Según los resultados obtenidos de la extracción secuencial, la movilidad aparente y la potencial disponibilidad de los MP en el suelo fue  $Zn > Cu > Cr$ . Cabe destacar, que los contenidos de Cu-EX y Cr-EX fueron menores al 2 y 1% con respecto al contenido total de los mismos.

La aplicación de enmiendas modificó ligeramente las características químicas del suelo. Inicialmente el pH aumentó y la CE disminuyó con la aplicación de ambas enmiendas, comparado con el suelo sin enmendar. Sin embargo, no se encontró correlación entre estos parámetros y los MP biodisponibles en suelo. Al final del ensayo, se observó acidificación en todos los tratamientos, sin observarse modificaciones estadísticamente significativas.

#### 4.3.b. Eficiencia de la fitorremediación con especies nativas de *Sesbania*

Las especies de *Sesbania* mostraron diferente respuesta frente a la contaminación y la aplicación de enmiendas. En general, se observó que las plantas de *S. virgata* tuvieron significativamente mayor biomasa que las de *S. punicea*, observándose este patrón tanto para la parte aérea como subterránea (Figura 4.3.b.1).

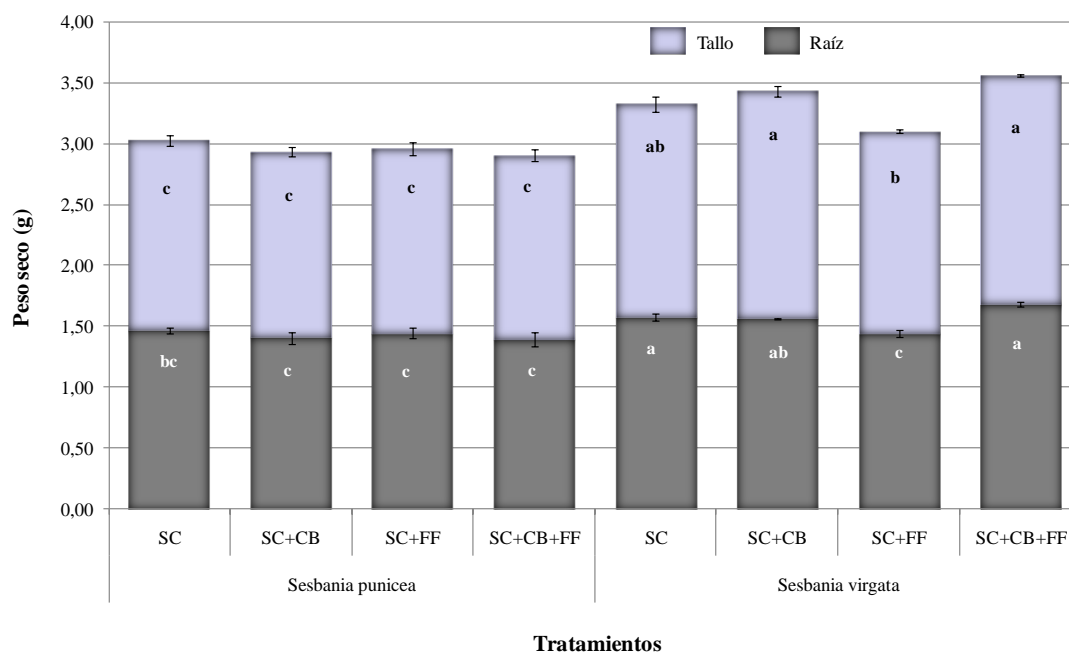


Figura 4.3.b.1: Peso seco de *Sesbania virgata* y *Sesbania punicea* en función de los tratamientos, para el final del ensayo. Letras diferentes entre columnas del mismo color indican diferencias significativas entre tratamientos, según el análisis factorial ( $p < 0,05$ ). SC = suelo contaminado, CB = compost de biosólido, FF = fertilizante fosfatado.

La Figura 4.3.b.1, también muestra que la aplicación de enmiendas generó una ligera disminución de la biomasa aérea de *S. punicea*, con respecto a la no aplicación de enmiendas. Por el contrario, la biomasa aérea de *S. virgata* fue mayor para los tratamientos con aplicación de compost de biosólido, siendo aún mayor con aplicación de ambas enmiendas en conjunto. La respuesta de *S. virgata* frente a la aplicación de compost de biosólido, también se manifestó en la biomasa total de las plantas (Cuadro 4.3.b.1, (contraste 1)). Similar a lo observado en la biomasa total, se observó que la longitud total de las plantas de *S. virgata*, en los tratamientos donde se aplicó compost de biosólido, fue mayor que la longitud de las plantas de *S. punicea* bajo los mismos tratamientos (Figura 4.3.b.2, Cuadro 4.3.b.1, (contraste 2)).

Cuadro 4.3.b.1: Análisis de ANOVA, valores p del arreglo factorial de los datos y resultados de los contrastes entre los tratamientos para probar los efectos de la contaminación y la aplicación de enmiendas en las variables medidas de ambas especies de *Sesbania*.

ANOVA (valores de p)	Peso Seco Total (g)	Longitud Total (cm)
Planta	< 0,001	< 0,001
Enmiendas	NS	NS
Planta x Enmiendas	0,016	< 0,001
<b>Contrastes</b>		
<b>1. Enmienda vs Planta</b>		
SC+Sv & SC+Sv+FF vs SC+Sv+CB & SC+Sv+CB+FF	0,0035	< 0,0001
<b>2. Planta vs Enmienda</b>		
SC+Sp vs SC+Sv	NS	0,0025
SC+Sp+CB vs SC+Sv+CB	0,0053	< 0,001
SC+Sp+FF vs SC+Sv+FF	NS	NS
SC+Sp+CB+FF vs SC+Sv+CB+FF	< 0,001	< 0,001

Nivel de Significancia  $p < 0,05$ ; NS= no significativo

Cabe destacar, que la longitud del tallo de las plantas de *S. virgata* fue significativamente superior a la longitud de *S. punicea*, solamente para los tratamientos con aplicación de compost, y esa diferencia fue máxima cuando se aplicaron ambas enmiendas en conjunto. A su vez, para el mismo tratamiento se observó que las plantas de *S. virgata* presentaron el mayor diámetro comparado con los otros tratamientos ( $p = 0,0002$ ).

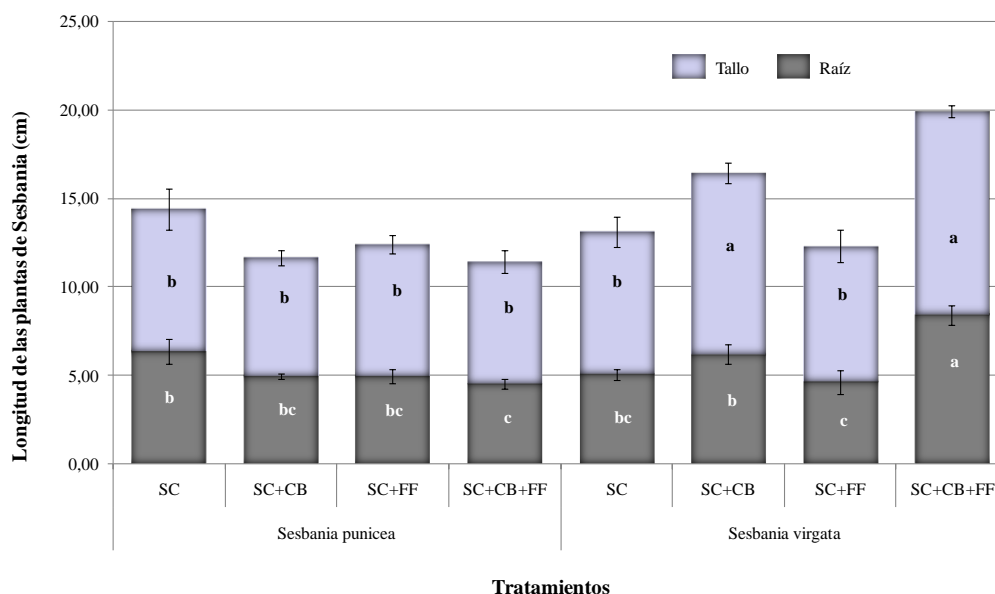


Figura 4.3.b.2: Longitud de los diferentes tejidos de las plantas de *Sesbania virgata* y *Sesbania punicea* en función de los tratamientos, para el final del ensayo. Letras diferentes entre columnas del mismo color indican diferencias significativas entre tratamientos, según el análisis factorial ( $p < 0,05$ ). SC = suelo contaminado, CB = compost de biosólido, FF = fertilizante fosfatado.

Al analizar el contenido de metales absorbidos por las plantas, se encontró que ambas especies de *Sesbania* absorbieron mayor cantidad de Cu y de Cr en los tratamientos donde no se aplicaron enmiendas (Figura 4.3.b.3, (a) y (c)). Además, la absorción de estos dos MP disminuyó en los tratamientos donde se aplicó CB. Por un lado, en ambas especies, la menor absorción de Cu se observó en el tratamiento con aplicación combinada de enmiendas orgánica e inorgánica, con respecto al tratamiento sin aplicación de enmiendas (Figura 4.3.b.3 (a), Cuadro 4.3.b.2, (contraste 1)). Por el otro lado, dentro de los tratamientos con aplicación de enmiendas y especialmente para *S. virgata*, el tratamiento con aplicación de compost de biosólido solamente, se observó la menor absorción del Cr con respecto a los tratamientos con aplicación de fertilizante fosfatado (Figura 4.3.b.3 (c), Cuadro 4.3.b.2, (contraste 1)). En cuanto al Zn, se observó que para *S. punicea*, la aplicación de enmiendas no disminuyó la absorción, sino que la aumentó comparado con el suelo sin aplicación de enmiendas. Contrariamente, para *S. virgata*, la aplicación de compost de biosólido solo o en conjunto con fertilizante fosfatado, disminuyó el contenido de Zn en planta con respecto a no incorporar ninguna enmienda o a incorporar fertilizante fosfatado solo (Figura 4.3.b.3 (b), Cuadro 4.3.b.2, (contraste 1)).

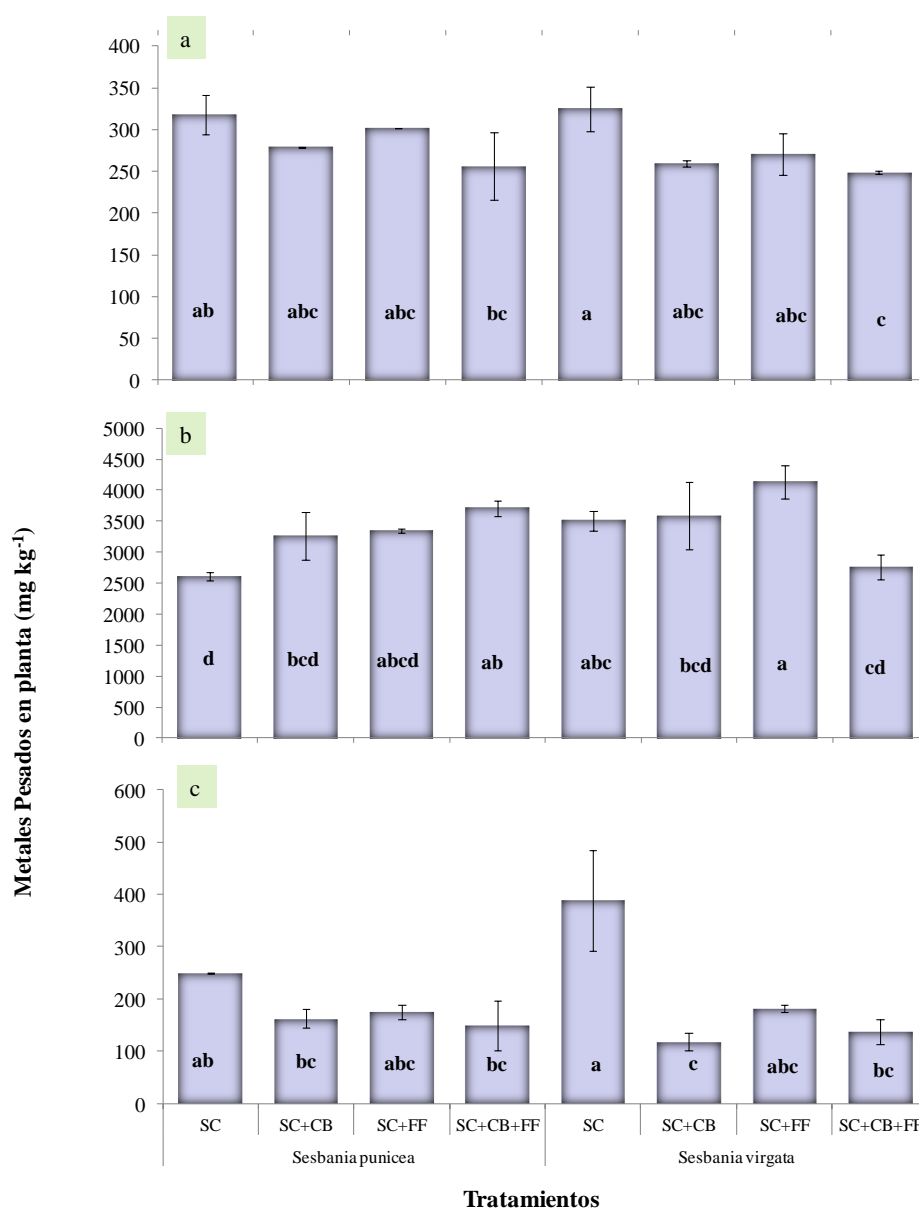


Figura 4.3.b.3: Contenido de MP en planta, en función de los tratamientos. a) concentración de Cu, b) concentración de Zn, y c) concentración de Cr. Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas entre tratamientos, según el análisis factorial ( $p < 0,05$ ). SC = suelo contaminado, CB = compost de biosólido, FF = fertilizante fosfatado.

Asimismo, la absorción de Zn, se diferenció significativamente entre las especies de *Sesbania* solamente en los tratamientos sin aplicación de enmiendas y con la aplicación de ambas enmiendas en conjunto (Cuadro 4.3.b.2, (contraste 2)).

Cuadro 4.3.b.2: Análisis de ANOVA, valores p del arreglo factorial de los datos y resultados de los contrastes entre los tratamientos para probar la concentración de MP en las plantas de *Sesbania* en función a la aplicación de enmiendas.

ANOVA (valores de p)	Metales pesados en planta (mg kg <sup>-1</sup> )		
	Cu	Zn	Cr
Planta	NS	NS	NS
Enmiendas	0,05	NS	0,01
Planta x Enmiendas	NS	0,02	NS
<b>Contrastes</b>			
<b>1. Enmienda vs Planta</b>			
SC+Sv vs SC+Sv+CB & SC+Sv+FF & SC+Sv+CB+FF	0,027		0,009
SC+Sp vs SC+Sp+CB & SC+Sp+FF & SC+Sp+CB+FF		0,024	
SC+Sv vs SC+Sv+CB+FF	0,033		0,031
SC+Sv & SC+Sv+FF vs SC+Sv+CB & SC+Sv+CB+FF		0,007	0,015
SC+Sp & SC+Sp+CB vs SC+Sp+FF & SC+Sp+CB+FF		0,05	
SC+Sv vs SC+Sv+CB	0,05		0,005
<b>2. Planta vs Enmienda</b>			
SC+Sp vs SC+Sv		0,039	
SC+Sp+CB+FF vs SC+Sv+CB+FF		0,031	

Nivel de Significancia  $p < 0,05$ ; NS= no significativo

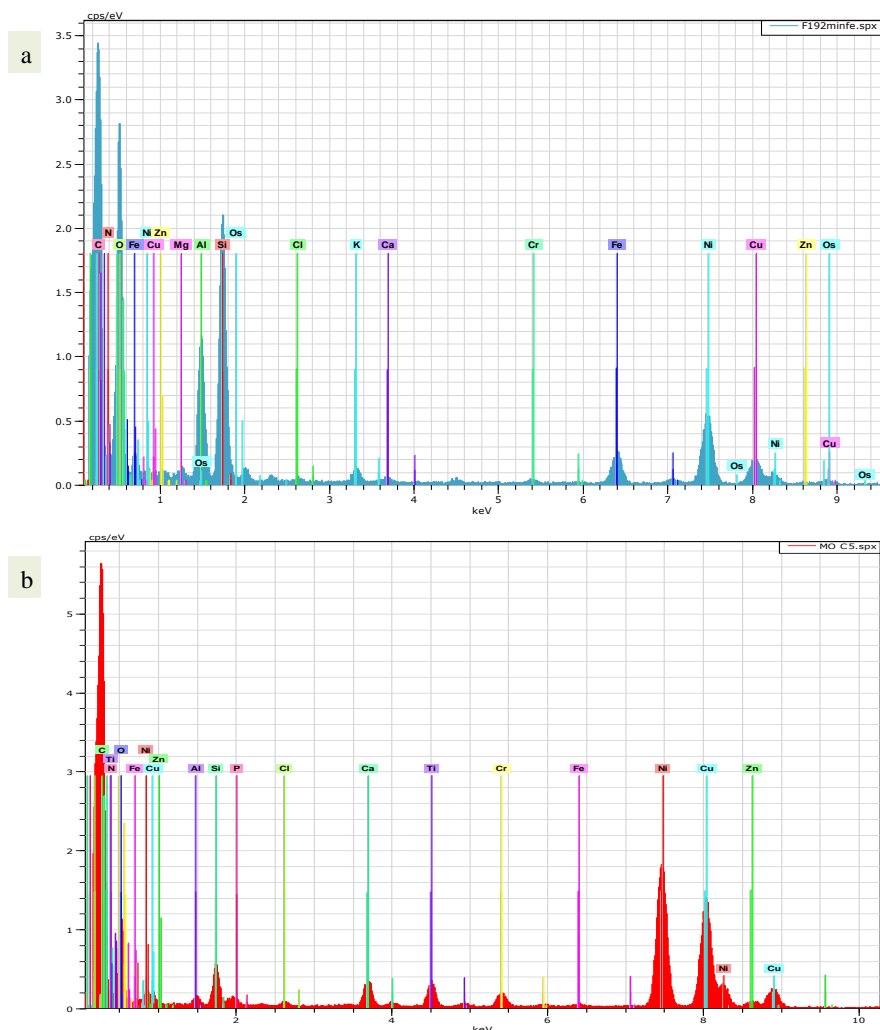
Cabe mencionar, que con la aplicación compost de biosólido y de ambas enmiendas en conjunto, disminuyó la biodisponibilidad de Cu y Cr ya que el contenido de Cu y Cr en las especies de *Sesbania* fue menor (Figura 4.3.b.3), y que a su vez, también disminuyó el contenido soluble de estos MP en los suelos (Figura 4.3.a.1). Sin embargo, no se encontraron relaciones lineales significativas entre ellos.

#### 4.3.c. Especiación de MP

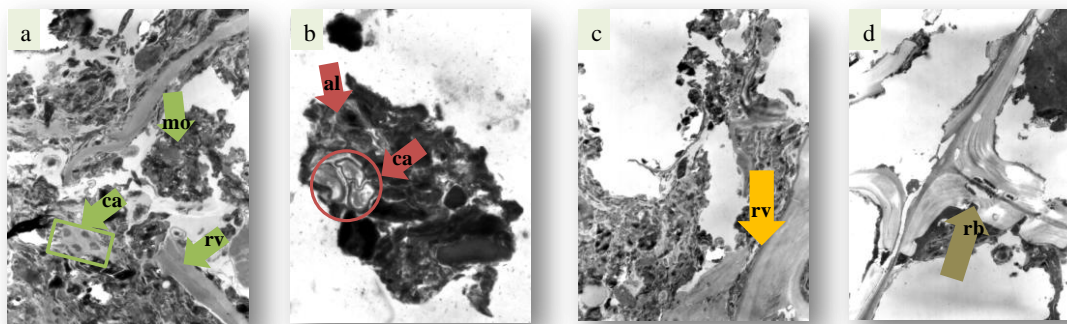
En la caracterización morfológica y analítica de las muestras de suelo prístino, al igual que en los suelos contaminados y remediados, el cuarzo, los agregados órgano-minerales, la fina materia orgánica como agente estabilizante y los microorganismos también fueron los principales componentes del mismo (Imagen 4.3.c.1). Tal es así, que en las secciones ultrafinas de las muestras del suelo contaminado y remediado, en general se pudo observar que estaban constituidas principalmente por cuarzo, Si y O (Espectro 4.3.c.1 (a y b)). En particular, en los análisis realizados al suelo con aplicación de estrategias de remediación, tanto en la fracción limo como en la orgánica, se observaron complejos órgano-minerales formados por materia orgánica de bajo peso molecular, partículas de arcilla y residuo microbiano (Figura 4.3.c.1 (a-d)).



Espectro 4.3.c.1: Espectros EDX. Caracterización de las muestras de suelo prístino correspondientes a un Hapludol típico, mediante TEM. Proporciones relativas de los elementos constituyentes de las muestras de suelos estudiadas para la fracción limo (a) y materia orgánica (b).



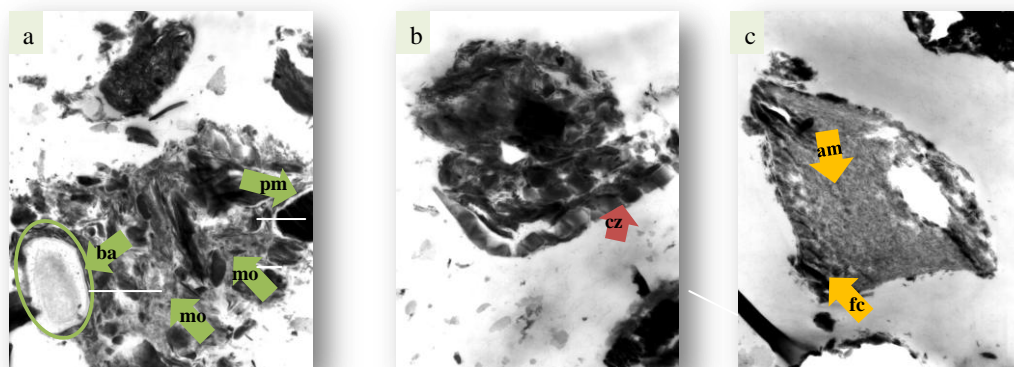
En todas las imágenes, se observó que la materia orgánica estaba en proceso de degradación, ya que solo se identificaron fragmentos celulares provenientes de la pared vegetal (Imagen 4.3.c.1 (b) y (c)). Asimismo, en la Imagen 4.3.c.1 (d) se observó lignina degradada y residuos celulares provenientes de la pared celular, así como materia orgánica degradada no pudiendo reconocer su origen.



mo = materia orgánica, rv = residuo vegetales, ca = colonia bacteriana, al = área de lisis, rb = residuo bacteriano

Imagen 4.3.c.1. Imágenes obtenidas de la fracción limo y materia orgánica del suelo remediado (SC+FF+CB+Sv), a través de Microscopía de transmisión electrónica (magnificación de la imagen = x 10.000, voltaje = 80 kV). a) Imagen de material vegetal y de colonia bacteriana en proceso de degradación, b) agregado órgano-mineral con fina materia orgánica, arcillas y residuos de colonia bacteriana, c) residuos de células vegetales, y d) material ligno-celulósico en proceso de degradación.

En cuanto al examen de los MP, el análisis de las secciones pertenecientes a la fracción limo y arcilla del suelo contaminado, evidenció una mayor proporción de Cr unido a esa fracción, en comparación con minerales similares al suelo prístino. Por otro lado, en el suelo remediado, se identificó al Cu unido en mayor proporción a la materia orgánica (Espectro 4.3.c.1 (b)), el Cr sorbido ligeramente a la fracción mineral y en cuanto al Zn no se pudo reconocer un comportamiento de unión específico.



pm = partícula mineral, mo = materia orgánica, ba = bacteria, cz = cuarzo, am = formas amorfas, fc = formas cristalinas

Imagen 4.3.c.2. Composición de las muestras del suelo Hapludol típico en su estado prístino (magnificación de la imagen = x 10000, voltaje = 80 kV). a) agregado órgano-mineral, compuesto por fina materia orgánica, bacteria y partículas minerales. b) mineral primario de cuarzo. c) partícula mineral en forma degradada (amorfa) y no degradada (cristalina).

## 4.4. DISCUSION

### 4.4.a. Efecto de las estrategias de remediación en la distribución de MP

La distribución de cada uno de los MP estudiados entre los componentes del suelo (Cuadro 4.3.a.1) están en concordancia con otros estudios, los cuales demostraron que la adsorción es un proceso metal-específico (Welp y Brummer 1999; Gomes et al. 2001).

La gran afinidad del Cu por la materia orgánica y carbonatos del suelo (Cuadro 4.3.a.1, (i-EX y i-OC)) corrobora los resultados encontrados por otros autores, quienes indicaron que el Cu se asocia a las fracciones menos lábiles del suelo (Ali et al. 2004; Gondek 2006; Orroño 2011). Los resultados obtenidos en este trabajo, sugirieron que la materia orgánica cumple un rol fundamental en la adsorción de los MP, siendo el Cu el metal que preferentemente se asoció con la fracción orgánica (Dragovic et al. 2008). En tal sentido, según los resultados de el Cuadro 4.3.a.1, (i-EX y i-OC), y de acuerdo con los estudios de Lagomarsino et al. (2011), el procedimiento de extracción secuencial en el suelo contaminado mostró que el Cu se asoció principalmente en las fracciones ácido-soluble y reducible, y en el suelo enmendado con CB, la presencia de Cu en las fracciones soluble e intercambiable se redujo. Una posible explicación a este resultado es la precipitación y/o la complejación del Cu por la presencia de materia orgánica estabilizada del compost, como por ejemplo las sustancias húmicas (Cuadro 4.2.2) (O'Dell et al. 2007; Cao et al. 2009). Por otro lado, el bajo contenido de Cu en la fracción soluble, también podría sugerir que existe baja contribución desde los complejos solubles de Cu-materia orgánica, por lo que los complejos Cu-materia orgánica son estables en el tiempo (Adamo et al. 2006). Al final del ensayo y en los tratamientos con aplicación de CB, se observó mayor contenido de Cu en la fracción residual, lo cual indicaría que existió una mayor insolubilización del mismo. Las principales causas de la inmovilización del Cu podrían explicarse por su afinidad al oxígeno cargado negativamente, por lo que su unión con la materia orgánica, y a los óxidos e hidróxidos de hierro y manganeso, permiten su adsorción específica mediante atracción electrostática, reduciendo su movilidad en el suelo (Stevenson 1994; Garrido et al. 2006; Kumpiene et al. 2008).

Al igual que lo encontrado por otros autores, los resultados del fraccionamiento secuencial evidenciaron que el Cr fue el elemento menos lábil con respecto al Cu y al Zn, asociándose principalmente a la fracción residual y unida a carbonatos (Cuadro 4.3.a.1 (i, ii y iii) (Abdel-Sabour 2007; Orroño 2011; Uwumarongie-Ilori et al. 2012). Considerando la naturaleza arenosa del material parental del suelo, el Cr pudo haber co-precipitado con varias especies de silicatos y consecuentemente ser adsorbido dentro de la fracción mineral del suelo (Uwumarongie-Ilori et al. 2012). Asimismo, los óxidos de Fe y Mn también pudieron jugar un papel importante en la adsorción del Cr, especialmente ya que se tratan de suelos ligeramente ácidos (Adriano 2001; Gondek 2006).

El aumento en la inmovilización del Cr en el suelo pudo estar influenciada por la aplicación de enmiendas orgánicas, factor importante en reducir aproximadamente el 90% del Cr(VI) agregado, pasando a Cr(III), el cual es menos tóxico e inerte hacia la re-oxidación (James et al. 1997; Kumpiene 2003; Bolan et al. 2003). Si bien en un estudio realizado por Santiago y Santhamani (2010), se evidenció la disminución del Cr soluble con la incorporación de enmienda orgánica, en nuestro estudio no se pudo observar dicha respuesta, debido a la baja concentración de Cr-EX. Cabe destacar, que la presencia de especies vegetales en el suelo, generó que el Cr incrementara su

concentración en las fracciones menos lábiles, favoreciendo su inmovilización (Cuadro 4.3.a.1 (iii-RES y iii-CR)). Esto coincide con lo reportado por Hawley et al. (2004), quienes indicaron que la estabilización del Cr puede ocurrir vía reducción en la zona radical, con la subsecuente precipitación o adsorción.

La predominancia del Zn en la fracción más lábil del suelo (Cuadro 4.3.a.1), coincide con los resultados encontrados por Bert et al. (2012), quienes reportaron que el Zn extractado con una sal débil, presentó mayor porcentaje con respecto a los otros MP estudiados. Asimismo, la implantación de las especies de *Sesbania*, pudo reducir la concentración de Zn móvil, ya sea por absorción de los mismos o por su estabilización, debido a los exudados radicales que permitieron la precipitación en la matriz del suelo (USEPA 2000; Tangahu et al. 2011).

La aplicación de fertilizante fosfatado incrementó el contenido de Zn en la fracción soluble e intercambiable del suelo, lo cual concuerda con los resultados encontrados por Waterlot et al. (2011), quienes confirmaron que la incorporación de fertilizante fosfatado soluble no fue efectivo en producir la retención del Zn. De hecho, solamente unos pocos estudios pudieron confirmar la presencia de compuestos Zn-fosfato (Cotter-Howells 1996; Cao et al. 2003; Sarret et al. 2004; Williams et al. 2011). Según otros estudios, este incremento en la disponibilidad, producido al incorporar fertilizante fosfatado puede estar asociado con la acidificación del suelo (Basta y Sloam 1999; Baker et al. 2012). Consecuentemente, para remediar suelos con Zn, el uso de fertilizantes fosfatados debería estar acompañado de enmiendas calcáreas, para reducir el potencial incremento del Zn disponible (Hettiarachchi et al. 2001).

Asimismo y de acuerdo a lo encontrado por otros autores, no puede excluirse el hecho de que la adición simultánea de cationes metálicos puede afectar la adsorción del Zn, debido a la competencia iónica entre los MP estudiados (Fontes y Gomez 2003; Kumpiene et al. 2007). Sumado a esto, el rol de los silicatos amorfos de Al y la interacción entre arcillas y materia orgánica del compost, con la formación de complejos órgano-arcillosos, podrían haber incrementado la capacidad de adsorción del suelo, estimulando la competencia entre estos MP (Adamo et al. 2006). Consecuentemente, y de acuerdo a los resultados de Kumpiene et al. (2007), si se considera una secuencia de Zn, Cu y Cr en función a su movilidad relativa, el Zn fue el elemento con mayor movilidad y solubilidad en agua, estando inmediatamente disponible para la absorción por plantas o por la biota del suelo, y presentando mayor riesgo de lixiviarse a aguas subterráneas con mayor riesgo ambiental comparado con los otros MP (Fuentes et al. 2004; Pueyo et al. 2008).

Según Flogeac et al. (2007), la presencia simultánea de Cu, Zn y Cr en altas concentraciones, reduce la retención de los mismos, ya que existe fuerte competencia entre ellos por los sitios de adsorción del suelo. En tal sentido, asumiendo que la movilidad y la disponibilidad de estos MP están asociadas a su solubilidad y formas químicas, y tomando en cuenta que los MP se reducen en el orden de la secuencia de extracción, la movilidad aparente y la disponibilidad potencial de Cu, Zn y Cr en este experimento fue de  $Zn > Cu > Cr$ . Además, estos resultados coinciden con los de Lafuente et al. (2008), quienes reportaron que en suelos con carbonatos, el Cr, Cu y Pb presentaron elevada afinidad por la fase sólida y reactiva del suelo, en comparación con el Ni, Zn y Cd.

Debido a que en este experimento se observó que el Cu y el Cr se asociaron mayormente a las fracciones no intercambiables y menos extractable respectivamente (Adamo 2006), y que el Zn se encontró en la fracción soluble e intercambiable, se

podría decir que existió una retención selectiva de MP. Más específicamente, en la competencia por los sitios de adsorción, el Cr se vio favorecido por la carga, y el Cu frente al Zn por la electronegatividad, la constante de hidrólisis y la capacidad de formar uniones covalentes (Sposito 1989; McBride 1997; Flogeac et al. 2007).

Si bien al inicio del ensayo el pH fue mayor, la acidificación observada en todos los tratamientos, al final del ensayo pudo deberse a la mineralización de la materia orgánica del suelo, a la formación de  $H^+$  por la solubilización del fertilizante fosfatado, y/o por la liberación de exudados radicales (Zubillaga y Lavado 2002; Tume et al. 2006).

#### 4.4.b. Eficiencia de la fitorremediación con especies nativas de *Sesbania*

Los resultados indicaron que las especies de *Sesbania* pudieron sobrevivir al menos 190 días en el suelo contaminado y durante el proceso de remediación. Al igual que Ye et al. (2001), la aplicación al suelo de enmienda orgánica (CB), incrementó la biomasa y la longitud total de *S. virgata* con respecto al tratamiento sin aplicación de enmiendas (SC+Sv) (Figura 4.3.a.1 y 4.3.a.2). Además, con la aplicación combinada de enmiendas orgánica e inorgánica, se evidenció un 18% más de biomasa de *S. virgata* comparado con el mismo tratamiento en *S. punicea*. Similar a otras especies de *Sesbania*, estos resultados indicaron que la combinación de enmiendas mejoró la supervivencia y el crecimiento de *S. virgata* (Yang et al. 2003).

Si bien la concentración de MP en planta mostró similar patrón entre las especies de *Sesbania*, cada metal se absorbió de manera diferencial. En función a la disponibilidad de los MP en el suelo (Figura 4.3.a.1), y coincidiendo con los resultados encontrados por Yang et al. (2003), ambas especies de *Sesbania* acumularon altas concentraciones de Zn, y menores concentraciones de Cu y Cr (Figura 4.3.b.3). Además, esta absorción diferencial de cada MP por ambas especies de *Sesbania* pudo estar influenciada por la presencia simultánea de los otros MP, sugiriendo un efecto antagónico o de competencia entre ellos (Israr et al. 2011). Sin embargo, la habilidad de estas plantas para tolerar y acumular MP en sus tejidos, resulta útil para los objetivos de fitorremediación planteados.

El incremento de la materia orgánica del suelo a través de la aplicación de compost de biosólido, además de mejorar la performance de las plantas de *S. virgata*, pudo actuar limitando la disponibilidad de Cu, Cr y Zn en el suelo, resultando en menor absorción por la planta (Yoon et al. 2006). Podría hipotetizarse que esto se debe a la inmovilización de los MP por la formación de complejos órgano-minerales (Kordel et al. 1997), o también por favorecer la absorción y acumulación en los tejidos vegetales, o mediante precipitación en la zona radical (Tangahu et al. 2011). Sin embargo, en este experimento no pudo corroborarse que dicho efecto mediante análisis de regresión lineal de los parámetros.

#### 4.4.c. Especiación de MP

Los espectros EDX obtenidos de la materia orgánica y de los materiales minerales finos pertenecientes a la matriz del suelo contaminado y remediado, permitieron detectar al cuarzo, Si y O como elementos componentes mayoritarios de las muestras, reflejando las proporciones relativas entre un elemento y otro. Según los resultados encontrados y concordando con lo hallado por Etchichury y Tofalo (2004),

en la Región Pampeana, los sedimentos superficiales, de naturaleza loésica, presentaron homogeneidad mineralógica, estando constituida predominantemente por minerales livianos de cuarzo, plagioclasas y feldespatos potásicos (fracción limo). Cabe aclarar que las secciones pertenecientes al suelo prístino, contenían niveles de MP correspondientes a suelos no contaminados (Lavado et al. 1998), a excepción de los aportados por el microscopio de transmisión electrónica.

Asimismo, mediante los microanálisis se corroboraron los resultados obtenidos por la extracción secuencial utilizada en el análisis cuantitativo, observando que cada MP se unió de diferente manera a las fracciones del suelo estudiadas. Los resultados del análisis cualitativo de las muestras de suelo coincidieron con los de otros autores, ya que el Cu se encontró preferentemente unido a la materia orgánica del suelo, el Cr se unió al material inorgánico en mayor medida, y el Zn no se unió preferentemente a ninguna fracción del suelo (Waterlot et al. 2011; Paradelo et al. 2011; Agnieszka y Gworek 2012). Sin embargo, al ser un estudio cualitativo, los resultados no permitieron evidenciar la significancia de la asociación de cada MP (Cu, Cr y Zn) con la materia orgánica o las formas minerales del suelo.

#### 4.5. CONCLUSIONES

El procedimiento de extracción secuencial de MP permitió proveer información útil para predecir las condiciones que influyen en la disponibilidad de los MP para la biota, evidenciando el riesgo que cada uno de estos MP significa para el ambiente. Los resultados cualitativos de microscopia pudieron complementar los datos brindados por la extracción secuencial. Ambas metodologías utilizadas para el estudio de la especiación química de MP, revelaron tanto en el suelo contaminado como en el suelo con estrategias de remediación, que el Cu se adhirió preferentemente a la materia orgánica del suelo, el Cr a la residual, y el Zn a la fracción soluble. Además, se pudo concluir que hubo mayor adsorción del Cu y Cr en el suelo estudiado respecto del Zn, y por ende, la absorción por las especies de *Sesbania* fue menor para el Cu y Cr y mayor para el Zn. Ambas especies de *Sesbania* se comportaron de manera similar a las especies asiáticas del mismo género, disminuyendo principalmente la movilidad del Zn.

Las prácticas remediadoras utilizadas resultaron útiles para disminuir la solubilidad de Cu, Zn y Cr a través de la modificación de su estado químico, influenciando además su biodisponibilidad y riesgo para el ambiente. Se concluye que la combinación de estrategias químicas y biológicas es necesaria para eficientizar la inmovilización de diferentes metales, teniendo en cuenta que cada metal reacciona de diferente manera frente a las estrategias utilizadas. La fitorremediación asistida es una estrategia necesaria para una exitosa remediación in situ de los suelos y para la recuperación del ecosistema.



Esquema 4.5: Esquema resumen del rechazo o no rechazo de las hipótesis planteadas al inicio del capítulo.

## **Parte C: Monitoreo de la remediación**

### **Capítulo 5. Monitoreo de las propiedades biológicas de un suelo remediado mediante estrategias químicas y biológicas: Uso de Bioindicadores de la calidad del suelo** <sup>¶</sup>

---

<sup>¶</sup> Parte de este capítulo ha sido publicado:

Branzini, A. y Zubillaga, M.S. 2012. Remediación y monitoreo de suelos contaminados con metales pesados. Editor: Editorial Española, LAP LAMBERT, Saarbrücken, Alemania. 58 pp. ISBN (978-3-8484-6848-5)



## 5.1. INTRODUCCION

El concepto de servicios ecosistémicos incluye los beneficios que las sociedades obtienen de los ecosistemas, lo cual permite hacer más explícita la interdependencia del bienestar humano y el mantenimiento del adecuado funcionamiento de los ecosistemas (Balvanera 2012). En tal sentido, el suelo provee al ecosistema importantes funciones (Garbisu et al. 2007). Un ejemplo de ello, es la función de albergar una amplia riqueza de especies vegetales, animales y microbianas, y sus procesos que determinan la función de los ecosistemas terrestres depende ampliamente de los procesos biológicos ocurridos en el suelo (Urzelai et al. 2000; Nogales 2005). Los organismos del suelo tienen un importante rol en una gran parte de los ciclos globales del carbono, nitrógeno, fósforo y azufre. La disponibilidad de estos elementos está influenciada de manera notable por la mineralización de la materia orgánica y por su humificación, ambas llevadas a cabo por los propios organismos del suelo (Hobbs y Harris 2001) (Figura 5.1.a). Asimismo, son esenciales para la contribución del mejoramiento de la estructura del suelo, permitiendo una mayor productividad y diversidad vegetal (De Deyn et al. 2003; Caravaca et al. 2005).

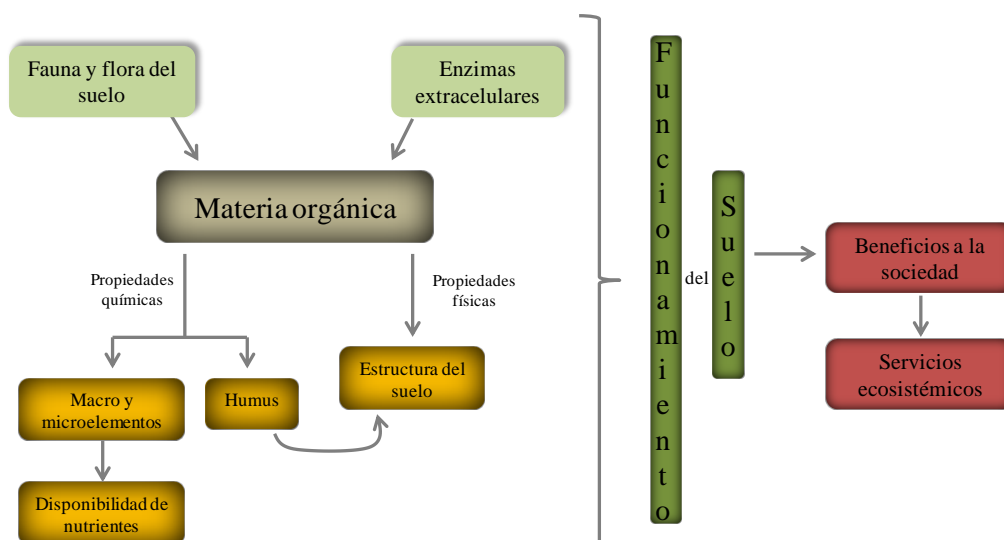


Figura 5.1.a: Funcionamiento ecológico del suelo llevado a cabo por la biota que forma parte del mismo, y beneficios otorgados a la sociedad.

Para el normal funcionamiento ecológico, la biota del suelo requiere una controlada concentración de algunos metales pesados (Cu, Zn, Cr, Fe, Mn, y Mo), ya que son cofactores en procesos enzimáticos y favorecen el correcto funcionamiento celular; no obstante, un mínimo aumento en la concentración de estos elementos por encima de determinados umbrales, puede generar alteraciones en la actividad de los microorganismos (Lee et al. 2002). Tal es así, que el impacto generado por la combinación entre la carga contaminante y la vulnerabilidad natural del ambiente frente a la contaminación, puede afectar negativamente la calidad del suelo en un tiempo relativamente corto (Nortcliff 2002). La disminución en la calidad del suelo puede reflejar una reducción en su funcionalidad, ya sea por la reducción de la biomasa y de la actividad microbiana del suelo, como resultado de la selección de organismos resistentes o tolerantes a los metales, que son metabólicamente menos efectivos (Giller et al. 1998); o por la inhibición de la

actividad de las enzimas hidrolasas, involucradas en el ciclado de nutrientes (Tyler et al. 1989). Debido a la creciente preocupación que la contaminación genera y con el fin de lograr la sustentabilidad de las funciones que provee el suelo, se ha propuesto utilizar indicadores biológicos como herramientas de evaluación de la calidad del suelo (Gil-Stores et al. 2005).

El uso de bioindicadores para evaluar sitios contaminados químicamente permite hacer una estimación directa, económica e integrada de la biodisponibilidad y toxicidad del contaminante (Maila y Cloete 2002). Una apropiada evaluación de suelos contaminados y un correcto monitoreo de la eficacia en la reducción de la disponibilidad de MP por los procesos de remediación con enmiendas inorgánicas y orgánicas (fertilizante fosfatado y compost de biosólido, nombrados en capítulos anteriores), debe realizarse combinando datos de análisis químicos y ecotoxicológicos (Juvonen et al. 2000). Tal es así, que para llevar a cabo esa evaluación surgió el interés en la utilización de bioindicadores, debido al hecho de su mayor sensibilidad, relevancia y rapidez de respuesta frente a las perturbaciones introducidas en el suelo, y sobre todo, por su carácter integrador (Alkorta et al. 2003).

Los posibles bioindicadores de la calidad del suelo pueden incluir desde organismos individuales a comunidades y procesos biológicos. Este capítulo contempla la utilización de indicadores desde tres visiones, una general que incluye la respiración microbiana total, y dos específicas que incluyen a la comunidad de nematodos y a los hongos micorrizicos.

### **5.1.a. Microorganismos del Suelo**

La diversidad biológica del suelo puede verse afectada negativamente una vez que los metales pesados ingresan al mismo, y de esta manera, afectar también al crecimiento y al metabolismo, así como la biomasa y la actividad de la biota de suelos (Giller et al. 1997; Giller et al. 1998; Maliszweska-Kordybach y Smreczak 2003). Diversos autores demostraron que la disminución de la diversidad y actividad de microorganismos, puede ser resultado tanto de la corta como de la larga exposición a metales pesados (Elsgaard et al. 2001; Sandaa et al. 2001; Akmal et al. 2005). En tal sentido, la utilización de prácticas estabilizadoras, como la aplicación de enmiendas orgánicas e inorgánicas, nombradas en apartados anteriores, producen cambios en la biodisponibilidad de MP y además incrementan tanto la biomasa como la actividad de los microorganismos (Perucci 1990; Walker et al. 2003). Dichas enmiendas, permiten también el reciclado de nutrientes y de materia orgánica presentes en las enmiendas y el mejoramiento de las propiedades físicas del suelo (Pascual et al. 1998; Álvarez et al. 1999).

Los microorganismos del suelo, presentan un enorme potencial como herramienta para monitorear la eficacia de un proceso remediador, ya que son sensibles a los cambios producidos en la calidad del suelo (Torstenson 1997; Garbisu et al. 2007). En particular, la alteración en la actividad de microorganismos podría ser un indicador sensible a los efectos antropogénicos sobre la ecología del suelo (Shi et al. 2002; Renella et al. 2005). La determinación de la actividad de microorganismos puede incluir la medición de diferentes procesos. Especialmente, uno de ellos, fácilmente medible, que puede cuantificar la actividad de los microorganismos del suelo es la respiración (Álvarez et al. 1995). La respiración microbiana se define como la absorción de oxígeno o la liberación de dióxido de carbono por bacterias, hongos, algas, protozoos y nematodos saprófagos, siendo resultado de la degradación de la materia orgánica. La liberación de CO<sub>2</sub> es el último paso de la mineralización del carbono. En un suelo perturbado es probable encontrar cambios en

la tasa de respiración del suelo debido principalmente al cambio en el crecimiento de la población microbiana y por ende en la mineralización. Por lo tanto, la evolución de CO<sub>2</sub> de un suelo es una medida de la actividad biológica total del mismo. En general, un descenso en la tasa de respiración estaría indicando una disminución en la actividad enzimática microbiana global y, por ende, en la mineralización de la materia orgánica. El efecto final producido por la disminución de todos estos procesos, es la alteración del normal funcionamiento del ecosistema (Valsechi et al. 1995; Hinojosa et al. 2004).

La respiración del suelo puede ser determinada directamente en el área de estudio (“*in situ*”) o bien en laboratorio (“*in vitro*”). Las mediciones *in situ* presentan grandes fluctuaciones y en general es dificultoso diferenciar entre la respiración proveniente de los microorganismos y la proveniente de la cobertura vegetal y de las raíces de las plantas. En contraste, las mediciones en laboratorio utilizan suelos bajo condiciones controladas de experimentación, son más fáciles de realizar, y se puede identificar la procedencia de la liberación de CO<sub>2</sub>.

### 5.1.b. Nematodos del suelo

Los nematodos constituyen la micro y mesofauna del suelo más numerosa y suelen encontrarse en sistemas acuáticos, marinos y de agua dulce, así como en sistemas terrestres, tanto en formas libres como parásitos de vertebrados, invertebrados y plantas (Freckman y Baldwin 1990; Ritz y Trudgill 1999). La capacidad de los nematodos para explotar todos los hábitats disponibles está reflejada en diversas adaptaciones morfológicas y fisiológicas: son alargados, en forma de hilo, lo que les permite desplazarse sin dificultad (Mondino 2001). Los nematodos terrestres presentan una pared del cuerpo, sistemas digestivo, nervioso, excretor y reproductor, pero carecen de un típico sistema circulatorio y respiratorio. La diversidad morfológica del sistema digestivo de los nematodos refleja adaptaciones a los distintos tipos de alimentación ya sea como herbívoros, parásitos, como consumidores de microflora, o asociándose a procesos de descomposición de materia orgánica y de ciclado de nutrientes (Brussaard et al. 2007). Tal es así, que generalmente se dividen entre 4 y 7 categorías de grupos tróficos, dentro de las cuales se pueden identificar Fitófagos, Fungívoros, Bacteriófagos, Predadores y Omnívoros (Yeates et al. 1993). Estos grupos tróficos pueden reflejar la estructura trófica, la cual es una clasificación funcional que contribuye a la comprensión de la estructura de la comunidad nematológica y de cómo cada grupo afecta a la transferencia de materia o energía en el ecosistema (Freckman y Ettema 1993).

Es posible inferir que los nematodos de vida libre desempeñan un rol importante en la dinámica de los suelos, ya que su acción incluye la oxigenación y distribución de gases en los suelos, la remoción o movimiento de partículas, disponibilidad de nutrientes y el control biológico de organismos patógenos (Linden et al. 1994). En función a estas actividades y a que la mayor abundancia de nematodos se encuentra en los primeros centímetros del suelo, la vida alrededor de los horizontes superficiales de los suelos se desarrolla equilibradamente (Eweis et al. 1999; Yeates et al. 2002). Consecuentemente, los nematodos son trascendentales para la regulación biótica de los procesos de reciclado y distribución de nutrientes y materia orgánica del suelo (Mondino 2001) (Figura 5.1.b).

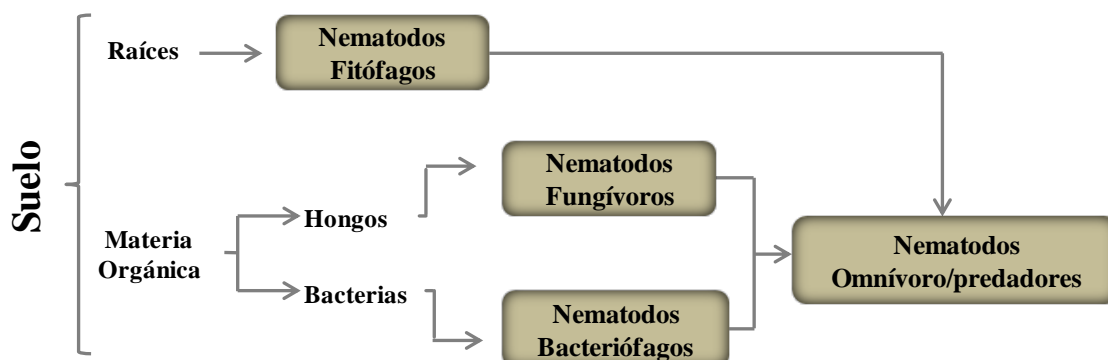


Figura 5.1.b: Diagrama de las fuentes de alimentación de los diferentes grupos tróficos de nematodos de vida libre en el suelo.

En tal sentido, la regulación de los procesos ocurridos en el suelo es función de la composición de la comunidad de nematodos o la estructura de la misma, la cual depende de los diferentes grupos tróficos que la conforman. La Figura 5.1.b sugiere que los nematodos bacteriófagos y fungívoros ayudan al reciclado y mineralización de nutrientes que fueron inmovilizados por la microflora del suelo, a través de su actividad alimenticia y excretora, disponiendo de esta manera, los nutrientes para el crecimiento de las plantas y la tasa de reciclado de la población microbiana del suelo (Coleman et al. 1984; Freckman 1988).

Debido a que las actividades antrópicas causan modificaciones en las condiciones del suelo, la comunidad de nematodos se considera una potente herramienta para conocer esos cambios (Bongers 1990; Ferris et al. 2001). Las variaciones en la misma se han utilizado a fin de determinar los efectos ecotoxicológicos de diferentes disturbios, ya sea contaminación con MP, acidificación, tratamientos con pesticidas y fertilización (Georgieva et al. 2002). Por ejemplo, la relación bacteriófagos/fungívoros, que indica la vía de degradación de la materia orgánica del suelo, bacteriana, fúngica o equilibrada, se ve modificada bajo condiciones acidificantes o en presencia de MP, lo cual sugiere un cambio en la funcionalidad del suelo. Las variaciones frente a la contaminación con MP estarían de acuerdo con las hipótesis de estrés desarrolladas por Odum et al. (1979) y Rapaport et al. (1985), las cuales asumen que el disturbio conduce al ecosistema a un estado primario de sucesión ecológica, ya que decrece la diversidad de especies y aumenta la dominancia de unas pocas. Esto tiene sentido al observar la proliferación de nematodos bacteriófagos, los cuales indican justamente estados iniciales de sucesión, ya que sus características biológicas los colocan como estrategas r. Sin embargo, algunos autores indicaron que los cambios en las características de la comunidad, ocurridos en respuesta a la contaminación con MP, pueden ser tanto cualitativos como cuantitativos (Yeates et al. 1995; Bardgett et al. 1999).

Cabe destacar que los principales atributos que presenta la estructura de las comunidades de nematodos y que son necesarios para ser considerados buenos indicadores, incluyen la elevada abundancia y diversidad, siendo ésta última más sensible al estrés ambiental en comparación con la abundancia (Bongers y Bongers 1998; Yeates y Bongers 1999). Otro atributo importante que presentan los nematodos, es el corto tiempo generacional, lo cual les permite responder rápidamente a los disturbios y adaptarse fácilmente a nuevas condiciones ambientales, como por ejemplo sobrevivir a estrés hídrico y volver a la actividad con el incremento del contenido hídrico (Bongers 1990; Urzelai et al. 2000). Asimismo los nematodos pueden ocupar

diferentes niveles de consumo dentro de la red trófica del suelo (De Ruiter et al. 2005), y pueden ser identificados fácilmente en diferentes grupos funcionales, es decir, taxones que tienen similar comportamiento en los procesos del ecosistema (Chapin et al. 1992). En general, los nematodos omnívoros son los más afectados por contaminación, mientras que los bacteriófagos pueden ser más resilientes a las perturbaciones ambientales (Bongers 1990; Weiss y Larink 1991; Freckman y Ettema 1993).

Pese a sus propiedades como indicadores de impactos antrópicos en los suelos, poco se conoce del equilibrio que puede lograr la comunidad de nematodos luego de la remediación química y biológica de suelos contaminados.

### 5.1.c. Glomalina del suelo

La Glomalina es una glicoproteína insoluble, de elevado peso molecular, la cual es producida por las hifas del hongo micorrízico arbuscular (HMA), encargado de incidir significativamente en el establecimiento y desarrollo de las plantas (Leake et al. 2004; Driver et al. 2005; Borie et al. 2006). Los hongos del orden Glomales y las raíces del 80% de las especies de plantas vasculares, forman asociaciones simbióticas, denominadas micorrizas arbusculares (Smith y Read 1997). En esta asociación, existe intercambio bidireccional hongo-planta, en donde ambas partes se benefician y mejoran su aptitud biológica, ya que el HMA recibe fotoasimilados de la planta, y le transfiere a la misma nutrientes minerales y agua proporcionados por sus estructuras filamentosas, las hifas fúngicas (Paszkowski 2006).

Por lo descripto, las asociaciones micorrízicas facilitan el crecimiento vegetal, y favorecen la revegetación de zonas degradadas, ya que permiten aumentar la capacidad de absorción de nutrientes de la planta, protege las raíces frente a la acción de patógenos (Newsham et al. 1995), mejora la tolerancia a la fitotoxicidad de MP (Pawlowska y Charvat 2004), y al déficit hídrico (Ruíz-Lozano y Azcón 1995).

Por su parte, la glomalina liberada por los HMA, presenta una vida media de 6 a 42 años, lo cual conlleva una lenta velocidad de degradación que depende del suelo de origen (Rillig et al. 2001). La estructura química aún se desconoce, aunque se ha informado que está compuesta por un complejo de aminoácidos, carbohidratos y hierro (< 5%) (Nichols 2003; Defrieri et al. 2012), además, de un elevado porcentaje de carbono (27,9 - 43,1%) (Rillig et al., 2003; Seguel et al. 2008). En tal sentido, esta glicoproteína constituye una fuente de carbono para el suelo, y promueve la agregación de la fracción inorgánica del suelo (Lovelock et al. 2004). En función a las características de solubilidad, se identifican dos pools de glomalina: i) Glomalina fácilmente extraíble (GFE), que corresponde a la fracción de más reciente formación, y ii) Glomalina total (GT) que representa la cantidad total de proteína tanto en la superficie como en el interior de los agregados (Pérez et al. 2012).

Una de las características de los HMA y de las glicoproteínas producidas por ellos, es el secuestro de elementos tóxicos tales como Cu, Cd, Pb, y Mn (González-Chavez et al. 2004), actuando así como un bioestabilizador para la remediación de sitios contaminados. En un estudio realizado por Klauberg-Filho (1999), se observó que en áreas donde existen altas concentraciones de MP, las plantas con micorrizas fueron menos afectadas que las sin micorrizas. Estas reducen la absorción de MP cuando se encuentran en exceso, inmovilizándolos temporariamente en las hifas, disminuyendo la translocación de esos elementos hacia la parte aérea (Leyval et al. 1996), o interfieren en el desbalance nutricional causado por el MP, aumentando por ejemplo, la absorción

de Fe (Siqueira et al. 1999). Asimismo, diversos trabajos sugirieron que las glomalinas son uno de los diversos compuestos pertenecientes a la materia orgánica con capacidad de adsorción de MP (Wright y Upadhyaya 1996; Hayes y Clapp 2001). Por lo descripto, la glomalina contribuye a la remediación de la contaminación del suelo mediante la complejación de elementos potencialmente tóxicos como MP (González-Chávez et al. 2004).

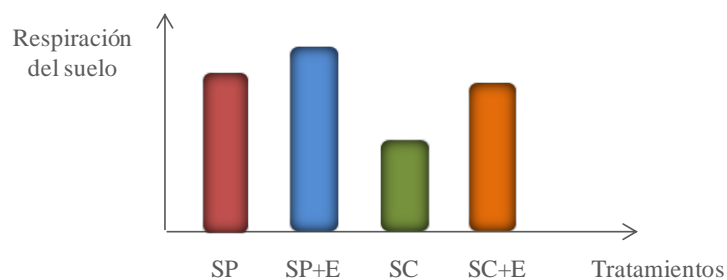
Los hongos micorrízicos arbusculares se han propuesto como indicadores de impactos antrópicos (Berbara et al. 2006), pero poco se conoce acerca de la capacidad que tienen las glicoproteínas exudadas por ellos, para ser utilizadas en el de monitoreo de remediación.

## **Objetivos**

1. Evaluar el efecto de la aplicación de compost de biosólido y de fertilizante fosfatado, sobre la actividad microbiana total del suelo contaminado con Cu, Zn y Cr.
2. Determinar el efecto de la remediación del suelo sobre la estructura trófica o funcional de la comunidad de nematodos. Calcular las relaciones entre los grupos tróficos o funcionales y su asociación con la disponibilidad de metales pesados en el suelo.
3. Cuantificar los pools de glomalina (fácilmente extraíble y total) en un suelo contaminado y remediado y buscar asociaciones entre ellos y la concentración biodisponible de MP.
4. Comparar los diferentes parámetros biológicos utilizados como indicadores.

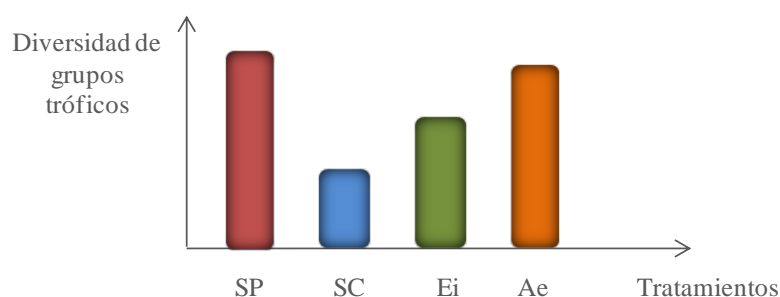
## **Hipótesis**

1. Mientras la contaminación del suelo con MP producirá descenso de la respiración de los microorganismos, la implementación de estrategias de remediación químicas (fertilizante fosfatado y compost de biosólido) producirá un aumento en la producción de CO<sub>2</sub>, que se asemejará a la respiración del suelo no contaminado y hasta lo superará. Asimismo, este aumento en la liberación de CO<sub>2</sub> se relacionará negativamente con la disponibilidad de los MP.



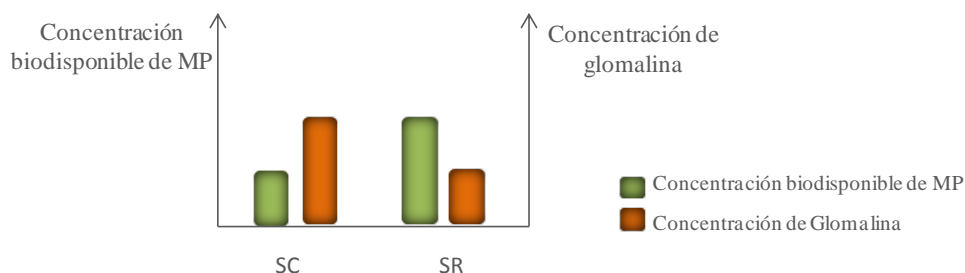
Esquema 5.1.1: Respiración total del suelo en función a los tratamientos. SP = suelo sin contaminar, SP+E = suelo sin contaminar + enmienda, SC = suelo contaminado con MP, SC+E = suelo contaminado + enmiendas.

- La remediación del suelo mediante estrategias químicas (fertilizante fosfatado y compost de biosólido) sólo recuperará la estructura trófica o funcional de la comunidad de nematodos cuando actúen en conjunto con estrategia biológica (*Sesbania*), recuperando los grupos funcionales superiores de la red trófica (omnívoros-predadores). Esto estará relacionado con la disminución en la disponibilidad de los MP en el suelo.



Esquema 5.1.2: Diversidad de grupos tróficos de nematodos del suelo en función de los tratamientos. SP = suelo sin contaminar, SC = suelo contaminado con MP, Ei = suelo remediado con estrategias individuales, Ae = suelo remediado con combinación de estrategias.

- La disponibilidad de MP por aplicación de estrategias químicas de remediación estará relacionada inversamente con el aumento en la concentración de glomalina, lo que se vincula, además, con una mayor producción de biomasa de las plantas de *Sesbania virgata*.



Esquema 5.1.3: Concentración de MP biodisponibles y concentración de glomalina del suelo en función de los tratamientos. SC = suelo contaminado con MP, SR = suelo con aplicación de enmiendas y plantas.

- La respuesta de la comunidad de nematodos evidenciará los cambios en la calidad del suelo en mayor medida, comparado con otros indicadores estudiados.

## 5.2. MATERIALES Y METODOS

Los tres experimentos llevados adelante en este capítulo, se realizaron con muestras de los 10 cm del horizonte superficial de un suelo Hapludol típico (Geo INTA), ubicado en un monte en la Estación Forestal INTA del partido de 25 de Mayo (35°28'43.97"S, 60°7'49.86"O), provincia de Buenos Aires. El muestreo de suelo se realizó de manera sistemática, en guarda griega (zig-zag), abarcando un área de 4 ha y obteniendo un total de cinco muestras compuestas de 10 kg cada una. Las muestras se secaron al aire y se homogeneizaron tamizándolas con malla de 2 mm. Los procedimientos de contaminación artificialmente y equilibrio con fase del suelo fueron los mismos que los explicados en el Capítulo 2. Para llevar a cabo los distintos experimentos, se utilizó suelo sin contaminar (como control) y suelo contaminado. Los niveles de MP del suelo contaminado fueron los máximos encontrados en la Región Pampeana: Cu: 700 mg kg<sup>-1</sup>, Zn: 1050 mg kg<sup>-1</sup>, y Cr: 116 mg kg<sup>-1</sup> (Llosa et al., 1990; Giuffré et al., 2005). Como enmiendas se utilizó fertilizante fosfatado (FF) y compost de biosólido (CB), siendo las dosis utilizadas equivalentes a 100 kg ha<sup>-1</sup> y 100 Mg ha<sup>-1</sup> respectivamente, las cuales se dejaron estabilizar con el suelo durante 100 días. La especie vegetal utilizada como remediadora fue *Sesbania virgata* (Sv).

Los tratamientos resultantes para cada experimento fueron:

- suelo prístino, sin contaminar (**ST**)
- ST + FF**
- ST + CB**
- ST + Sv**
- ST + CB + FF + Sv**
- suelo contaminado con MP (**SC**)
- SC + FF**



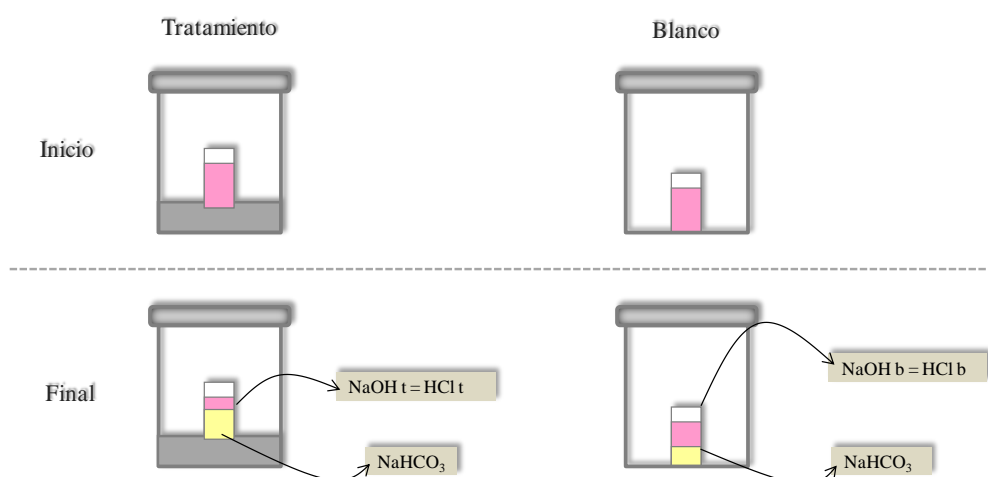
8. SC + CB

9. SC + Sv

10. SC + CB + FF + Sv

### 5.2. a. Experimento de liberación de C-CO<sub>2</sub> por la biota del suelo

Se realizó un experimento en estufa de incubación, basado en el trabajo propuesto por Álvarez et al. (1995), con pequeñas modificaciones. Se utilizaron frascos de 360 ml (cada frasco constituyó una unidad experimental), en los cuales se incorporaron 100 gr de muestra seca obtenida de cada tratamiento mencionado en el apartado anterior; y sobre la muestra dentro de cada frasco se colocó un recipiente con 5 ml de NaOH 1M, a fin de capturar el CO<sub>2</sub> liberado por la actividad microbiana. La incubación se realizó en estufa sin ventilación a una temperatura de 28° C y 60% de humedad equivalente. Los frascos se mantuvieron cerrados, abriéndose media hora diaria para mantener las condiciones aeróbicas. La liberación de C-CO<sub>2</sub> se midió mediante titulación con HCl 0.25M, utilizándose fenolftaleína como indicador (Esquema 5.2.a.1 e Imagen 5.2.a.1). La medición de C-CO<sub>2</sub> se realizó a los 15 días de comenzado el experimento de incubación.



Esquema 5.2.a.1: Esquema del ensayo de cuantificación de la respiración total del suelo. t = tratamiento; b = blanco



Imagen 5.2.a.1: (a) Frascos de vidrio de 360 ml con las muestras de suelo, (b) solución de NaOH 1M, y (c) titulación del excedente de NaOH con HCl 0.25M, con fenolftaleína como indicador.

## 5.2. b. Experimento de extracción, cuantificación e identificación de nematodos de vida libre

La técnica de extracción y cuantificación, así como la capacitación en la identificación de los grupos tróficos de los nematodos fue puesta a punto en el “Laboratorio de Biología de Suelos y Materia Orgánica” del Instituto de Agronomía, de la Universidad Federal Rural de Río de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, Río de Janeiro, Brasil.

### 5.2. b.1 Extracción de nematodos

El experimento se realizó en macetas de 250 cm<sup>3</sup>, incorporando el suelo contaminado con Cu, Zn y Cr en las distintas concentraciones indicadas anteriormente. Sobre una mesada de cultivo ubicada a 0,60 m por debajo de 12 tubos fluorescentes de luz fría, se dispusieron las macetas en las cuales se implantaron 3 plántulas de *S. virgata* con tamaño similar (peso promedio=0.30 gr) (20 días de crecimiento). El experimento fue realizado bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. La duración del mismo abarcó un período de 60 días luego de implantadas las plantas de *S. virgata*, y una vez concluido este período, se realizó un muestreo destructivo de las macetas para determinar el estado de la comunidad de nematodos de vida libre del suelo.

Los nematodos del suelo fueron extraídos a partir de 100 cm<sup>3</sup> de suelo siguiendo la técnica de flotación-centrifugación (Caveness y Jensen 1955). En una primera etapa, al suelo contenido en un tubo de 250 ml, se adicionó agua en una relación 1:3 (suelo: agua) y 2 cm<sup>3</sup> de caolín. La suspensión obtenida fue centrifugada a 3000 rpm durante 5 minutos. El material sobrenadante se descartó y a los tubos conteniendo el precipitado se les agregó una solución de sacarosa en una relación 2:1 (sacarosa: precipitado) de

densidad  $1,18 \text{ g (cm}^3\text{)}^{-1}$  y rápidamente fueron centrifugados durante 1 minuto a 3000 rpm. Todos los sobrenadantes fueron vertidos sobre un tamiz de  $38 \mu\text{m}$  de malla a  $45^\circ$ , a fin de obtener los nematodos de las muestras clarificadas (Imagen 5.2.b.1), y se colocaron en tubos de ensayo de 10 ml. Los nematodos extraídos fueron sometidos durante un máximo de 1 minuto, a una temperatura de  $60^\circ \text{C}$  a baño maría para matar a los mismos. El siguiente paso fue dejar reposar durante 30 minutos las muestras, y remover el exceso de sobrenadante utilizando una pipeta sin perturbar el fondo de la suspensión para reducir la suspensión de nematodos a 10 ml. Luego los nematodos se fijaron con una solución de formalina-glicerol al 4%.

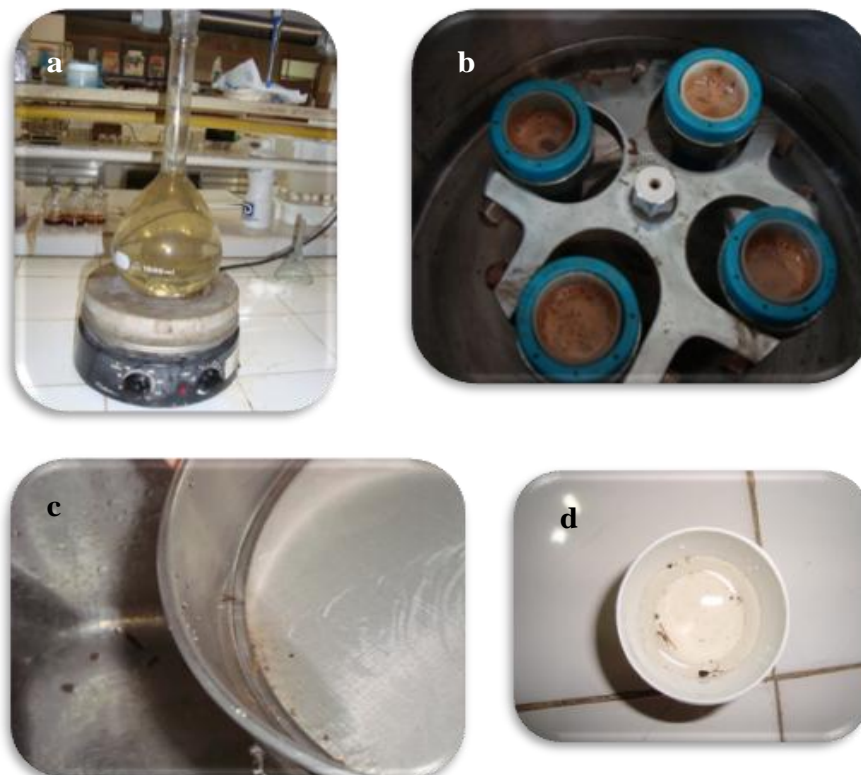


Imagen 5.2.b.1: (a) solución de glucosa, (b) centrifuga con las muestras de suelo más glucosa, (c) tamiz con los nematodos, y (d) solución acuosa con nematodos presentes luego de la extracción

### 5.2. b.2 Identificación de Grupos Tróficos

La abundancia de nematodos se estimó a partir de una alícuota de 5 ml tomada con pipeta del recipiente que los contenía, realizándose el recuento del número total de nematodos bajo microscopio estereoscópico (40x). La abundancia se calculó mediante la fórmula de Clark et al. (1971, en Morales y Pino 1987):

$$N = 100 \times (r/p)$$

Donde: N= número estimado de nematodos presentes en la alícuota, r = número de nematodos encontrados en la alícuota, y p = porcentaje del volumen total examinado en la alícuota.

Luego de contabilizar los nematodos, al menos 100 individuos por muestra fueron seleccionados al azar y se identificaron al nivel de grupos tróficos de alimentación (estructura trófica), bajo microscopio de luz (100x) (Imagen 5.2.b.2). La determinación se realizó teniendo en cuenta las descripciones previas (Heyns 1971; Yeates et al. 1993 y Chaves et al. 1995) identificando los siguientes grupos: bacteriófago, fungívoro, fitófago y omnívoro/predador.

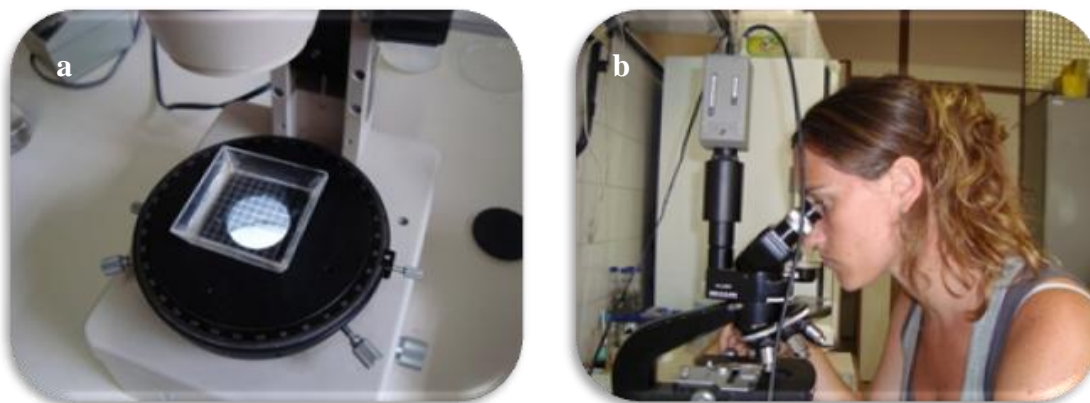


Imagen 5.2.b.2: (a) Contabilización de nematodos bajo lupa estereoscópica y (b) identificación de grupos tróficos de nematodos bajo microscopio

Asimismo, a fin de caracterizar la comunidad de nematodos, se calcularon diferentes índices ecológicos y relaciones entre grupos tróficos, los cuales describen la estructura y función del suelo (Biederman et al. 2008).

La diversidad de los grupos funcionales de la comunidad de nematodos (Freckman y Ettema 1993), se evaluó utilizando el Índice de Shannon de Diversidad Trófica ( $H'$ )

$$H' = - \sum P_i (\ln P_i),$$

y el Índice de Simpson de Dominancia ( $\lambda$ ), considerado como el inverso de la Diversidad Trófica

$$\lambda = \sum (P_i)^2$$

Donde:  $P_i$  = proporción de grupos tróficos de la comunidad (Shannon y Weaver, 1949).

Asimismo, a partir del Índice de Diversidad Trófica ( $H'$ ) se determinó el Índice de Equidad ( $J'$ )

$$J' = H' / H'_{\max}$$

Donde:  $H'_{\max} = 1,386$

También se consideraron diferentes relaciones entre los grupos tróficos considerados:

$$(1) \text{NCR} = \text{BF} / (\text{BF} + \text{FU})$$

Donde: NCR = indica la cadena de descomposición de la materia orgánica, BF = es el grupo trófico de los bacteriófagos y FU= es el grupo trófico de los fungívoros.

$$(2) \text{HERB} = (\text{BF} + \text{FU}) / \text{F}$$

Donde: HERB = indica la predominancia de la descomposición o de la herbivoría de la materia orgánica, F = fitófagos.

### 5.2. c. Experimento de extracción y cuantificación de Glomalina.

El experimento se realizó en macetas de 250 cm<sup>3</sup>, incorporando el suelo contaminado con Cu, Zn y Cr en las distintas concentraciones indicadas anteriormente. El experimento se realizó sobre una mesada de cultivo bajo condiciones controladas de luz y temperatura, en la cual se dispusieron las macetas donde se implantaron 3 plántulas de *S. virgata* con tamaño similar (peso promedio=0.30 gr) (20 días de crecimiento). El experimento fue realizado bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento, y el tiempo total del mismo fue de 60 días. Luego de transcurrido este período, se realizó un muestreo destructivo de las macetas para determinar el contenido de glomalina del suelo.

En función a las características de solubilidad, se identifican dos pools de glomalina: I- Glomalina fácilmente extraíble (GFE) y II- Glomalina total (GT). Estos pools fueron extraídos del suelo mediante la técnica de Wright y Upadhyaya (1998). La extracción del pool de GFE se realizó a partir de 1 g de suelo, con 8 ml de citrato de sodio 20mM, a una temperatura de 121°C y un pH 7,0 durante 30 minutos (en autoclave). La GT fue obtenida a partir de repetidas extracciones con 8 ml de citrato de sodio 50mM, a una temperatura de 121°C y un pH 8,0, en intervalos de 1 hora. Luego de cada ciclo de autoclave, el sobrenadante fue removido mediante centrifugación a 5000 r.p.m. durante 20 minutos y posteriormente fue filtrado (Imagen 5.2.4). El contenido de glomalina en el sobrenadante de cada uno de los pools fue cuantificado mediante el método de Bradford (Wright et al. 1996), comparándolas con una curva patrón a partir de seroalbúmina bovina (BSA).



Imagen 5.2.c.1: (a) Muestras de suelo y solución citrato de sodio en autoclave, y (b) extractos correspondientes a cada ciclo de extracción y posterior centrifugación.

#### 5.2. d. Análisis químicos en los experimentos

En cada uno de los experimentos llevados a cabo, los MP (Cu, Zn y Cr) del suelo fueron extraídos siguiendo la metodología desarrollada por Houba et al., (1990), mediante  $\text{CaCl}_2$  0,01M, en una relación 10:1 (agua: suelo). Luego del agitado y centrifugado, las concentraciones de los metales fueron determinadas mediante espectrofotometría de absorción atómica (AAS) en un equipo Perkin Elmer Analyst 300. El pH de las muestras de suelo se determinó en suspensión suelo: agua (1: 2,5) y contenido de sales solubles totales, estimado por conductividad eléctrica (CE) en suspensión suelo: agua (1: 2,5) (Faithfull, 2004), mediante equipo Thermo Orion 420A+ y Mettler Delta 320 respectivamente.

#### 5.2. e. Análisis estadístico

El diseño experimental fue un arreglo factorial. En el experimento 5.2.a, los datos fueron analizados mediante un ANOVA bajo un arreglo factorial 2x4 (niveles de contaminación y niveles de enmiendas) (Cuadro 5.2.1).

Cuadro 5.2.e.1: Diagrama del Arreglo factorial 2 x 4 de los tratamientos (contaminación x enmiendas)

Arreglo Factorial 2 x 4		Factor 1	
		suelo sin contaminar	suelo contaminado
Factor 2	sin enmienda	ST	SC
	con fertilizante fosfatado	ST+FF	SC+FF
	con compost biosólido	ST+CB	SC+CB
	con compost biosólido + fertilizante fosfatado	ST+CB+FF	SC+CB+FF

En cambio, en los experimento 5.2.b y 5.2.c, el arreglo factorial fue 2x5 (niveles de contaminación y niveles de remediación) (Cuadro 5.2.2).

Cuadro 5.2.e.2: Diagrama del Arreglo factorial 2 x 5 de los tratamientos (contaminación x remediación)

Arreglo Factorial 2 x 5		Factor 1	
		suelo sin contaminar	suelo contaminado
Factor 2	sin enmienda	ST	SC
	con fertilizante fosfatado	ST+FF	SC+FF
	con compost biosólido	ST+CB	SC+CB
	con <i>S virgata</i>	ST+Sv	SC+Sv
	con compost biosólido + fertilizante fosfatado + <i>S virgata</i>	ST+CB+FF+Sv	SC+CB+FF+Sv

Asimismo, cuando las diferencias fueron significativas, las medias se compararon aplicando test LSD, y se realizaron contrastes cuando se requirió comparar dentro de cada factor.

### 5.3. RESULTADOS

#### 5.3.a. Experimento de liberación de C-CO<sub>2</sub> por microorganismos

En la Figura 5.3.a.1 se muestra la liberación media de C-CO<sub>2</sub> luego de los 15 días de duración del ensayo de incubación de las muestras de suelo. En general y como se hipotetizó, el suelo sin contaminar liberó en promedio mayor cantidad de C-CO<sub>2</sub> en comparación con el suelo contaminado (72.83 %) (Cuadro 5.3.a.1, contraste 1). Por otro lado, también se observó para ambos suelos que la aplicación separada y conjunta de enmiendas orgánica e inorgánica, incrementó significativamente la liberación de C-CO<sub>2</sub> (Figura 5.3.a.1 y Cuadro 5.3.a.1, contraste 2). En particular, se observó que en el suelo sin contaminar la actividad biológica aumentó 66.3 % con compost de biosólido, 7.9 % con fertilizante fosfatado y 72.9 % con ambas enmiendas aplicadas conjuntamente.

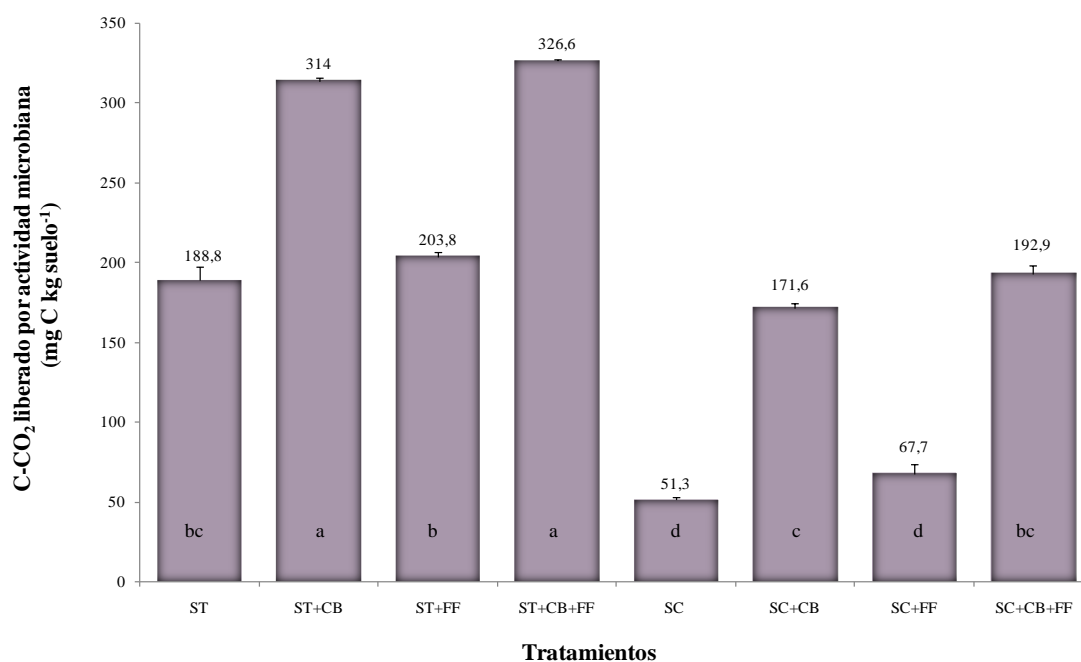


Figura 5.3.a.1: Producción media de C-CO<sub>2</sub> (mg C kg suelo<sup>-1</sup>) según los distintos tratamientos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ). ST = suelo sin contaminar, CB = compost de biosólido, FF = fertilizante fosfatado, SC = suelo contaminado con MP.

En el suelo contaminado el incremento en la actividad total fue de 234,5 % con la aplicación de enmienda orgánica, 31,9 % con la aplicación de fertilizante fosfatado (no significativo estadísticamente), y con la aplicación de ambas enmiendas en conjunto, la liberación de C-CO<sub>2</sub> aumentó un 276 % con respecto al suelo sin aplicación de enmiendas.



Cuadro 5.3.a.1: Análisis de ANOVA, valores p del arreglo factorial de los datos y resultados de los contrastes entre los tratamientos para probar los efectos de la contaminación y enmiendas en la liberación de C-CO<sub>2</sub>.

<b>ANOVA (valores de p)</b>	<b>C-CO<sub>2</sub> liberado</b>
Contaminación	<0,0001
Enmiendas	<0,0001
Contaminación x Enmiendas	NS
<b>Contrastes</b>	
<b>1. Contaminación vs Enmiendas</b>	
ST vs SC	<0,0001
ST+CB vs SC+CB	<0,0001
ST+FF vs SC+FF	<0,0001
ST+CB + FF vs SC+CB+FF	<0,0001
<b>2. Enmiendas vs Contaminación</b>	
ST vs ST+CB & ST+FF & ST+CB+FF	<0,0001
SC vs SC+CB & SC+FF & SC+CB+FF	<0,0001

Consecuentemente, según los resultados observados en la Figura 5.3.a.1, los porcentajes de incremento en la actividad biológica con la aplicación de enmiendas, fueron superiores en tratamientos de suelo contaminado, comparado con los porcentajes logrados en los tratamientos de suelo sin contaminar. En particular, cabe destacar que este aumento en la liberación de C-CO<sub>2</sub> fue el más alto en el suelo contaminado con incorporación de compost solo o acompañado de fertilizante, y ese aumento permitió que el suelo contaminado con aplicación de esas enmiendas se asemeje a la liberación de C-CO<sub>2</sub> del suelo prístino.

La Figura 5.3.a.2 muestra la disponibilidad de cada uno de los MP en función de los tratamientos. Se observó que cada metal reaccionó de manera diferente frente a las distintas estrategias de remediación. La aplicación de enmiendas orgánicas disminuyó la disponibilidad de Cu (Figura 5.3.a.2(a)), mientras que la aplicación de FF disminuyó la disponibilidad de Zn y Cr (Figura 5.3.a.2 (b y c)).

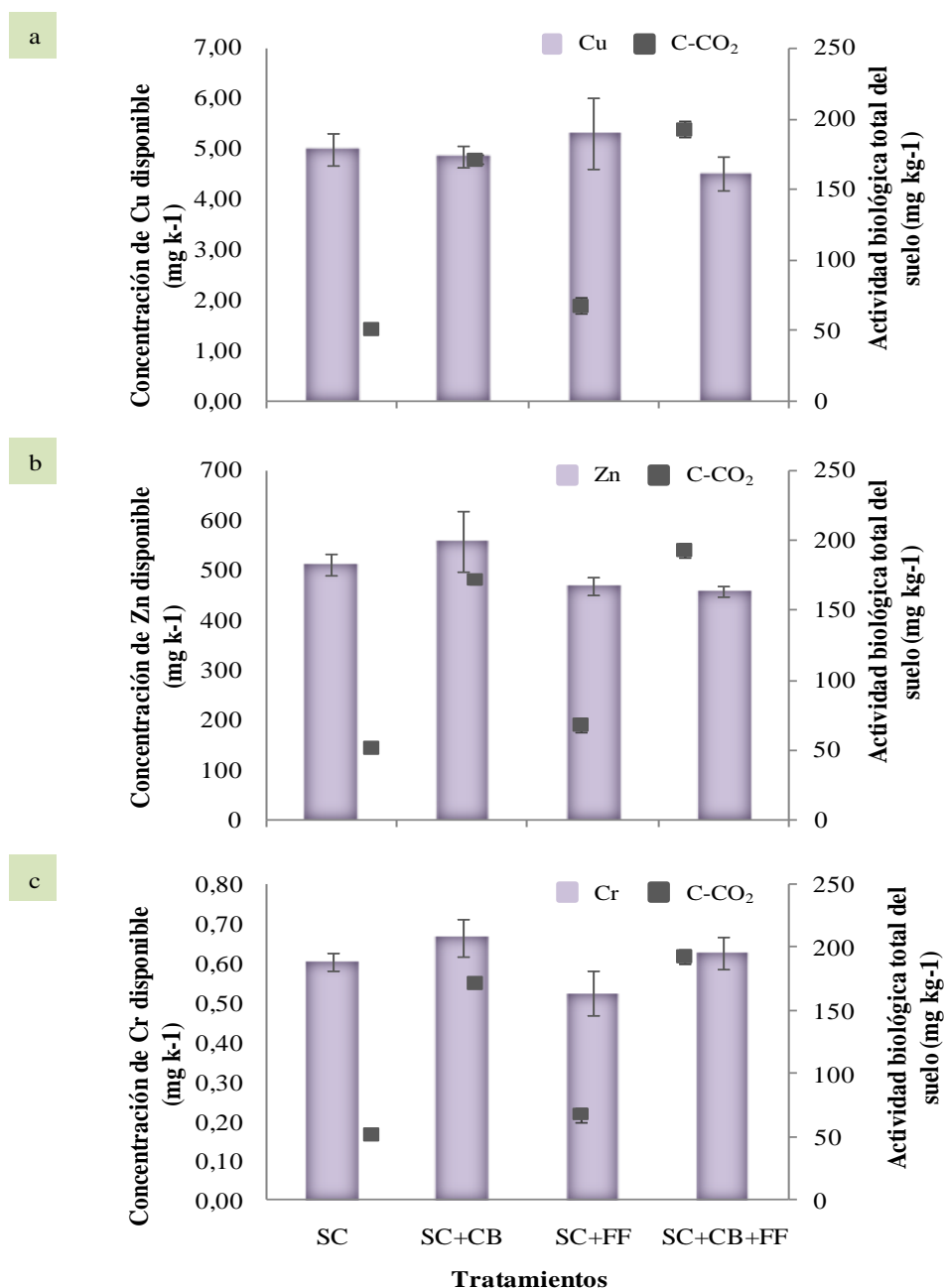


Figura 5.3.a.2: Concentración biodisponible de metales pesados y actividad biológica total del suelo en función a las estrategias de remediación utilizadas. Las líneas verticales indican el error estándar. SC = suelo contaminado, CB = compost de biosólido, FF = fertilizante fosfatado

Según los resultados mostrados en la Figura 5.3.a.1, la liberación de C-CO<sub>2</sub> fue mayor en los tratamientos de suelo contaminado donde se aplicó enmienda orgánica. Asociado a este resultado, en la Figura 5.3.a.2 (a) se observó que el aumento de la respiración coincidió con una reducción en la disponibilidad de Cu (coeficiente de correlación  $r = -0.82$ ). Por otro lado, y contrariamente a lo observado para el Cu, este aumento en la liberación de C-CO<sub>2</sub> se observó cuando la biodisponibilidad de Cr fue más elevada (coeficiente de correlación  $r = 0.70$ ) (Figura 5.3.a.2 (c)). Sin embargo, cabe destacar que ambas relaciones no fueron estadísticamente diferentes.

### 5.3.b. Experimento de extracción, cuantificación e identificación de nematodos de vida libre

La abundancia total de nematodos de vida libre del suelo, en función de cada tratamiento, se muestra en la Figura 5.3.b.1. En general, se identificó que en los tratamientos donde existió enriquecimiento con MP, el número de individuos totales fue menor en comparación con los tratamientos sin contaminar ( $p=0,0297$ ). Sin embargo, cabe destacar que no se encontró correlación lineal significativa entre cada uno de los MP y la abundancia total de nematodos.

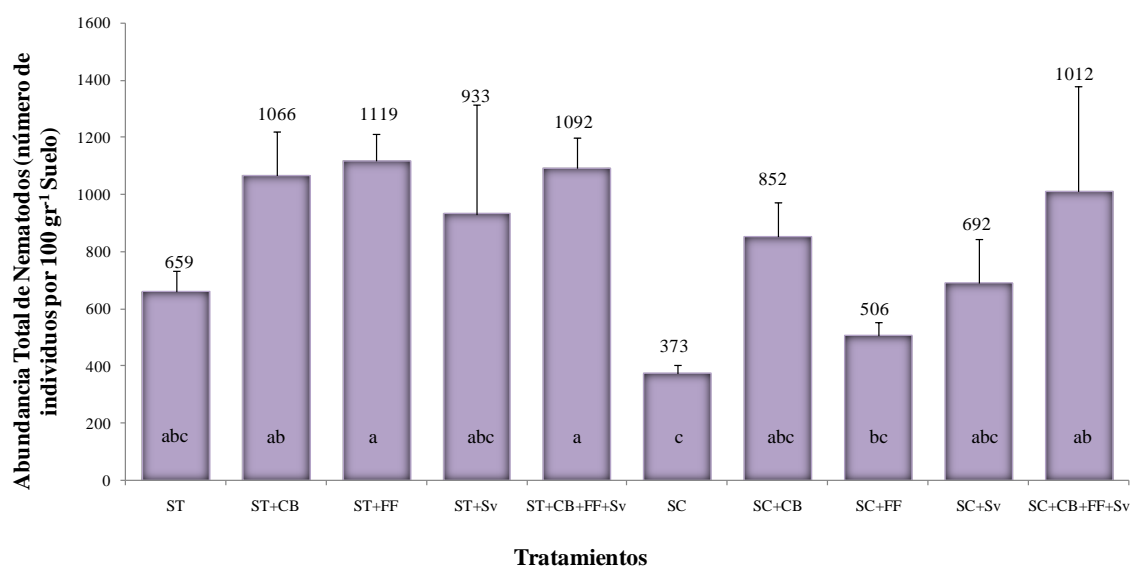


Figura 5.3.b.1: Abundancia promedio total de nematodos según los distintos tratamientos de suelo. Las líneas verticales indican el desvío estándar y letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p<0.05$ ). ST = suelo sin contaminar, CB = compost de biosólido, FF = fertilizante fosfatado, Sv = *Sesbania virgata*, SC = suelo contaminado.

En particular, se observó que el SC sin aplicación de enmiendas fue el tratamiento que presentó menor abundancia total en comparación con los otros tratamientos. También se observó para ambos suelos que la utilización tanto separada como conjunta de enmiendas orgánica e inorgánica y de fitoestabilización, incrementó significativamente la abundancia de nematodos. Por un lado, en el suelo sin contaminar la abundancia aumentó 61% con compost de biosólido, 81,9% con fertilizante fosfatado, 41,6% con *S. virgata* y 65% con todas las estrategias de remediación en conjunto. Por otro lado, entre los suelos contaminados, el porcentaje de aumento del tratamiento con CB fue de 128,4%, el del tratamiento con FF fue de 35%, y el del tratamiento con Sv fue de 85,5%. En el tratamiento de suelo contaminado con aplicación conjunta de enmiendas y *Sesbania virgata*, la abundancia tendió a aumentar aún más con respecto a los otros tratamientos de suelo contaminado, mostrando un 171% de aumento (Figura 5.3.b.1; Figura 5.3.b.2). Consecuentemente, cabe destacar, que en los tratamientos de suelo contaminado con incorporación de CB, la abundancia de nematodos fue mayor comparado con los tratamientos donde no se aplicó esta enmienda orgánica (Figura 5.3.b.1). Según los resultados encontrados, los porcentajes de incremento en la

abundancia de nematodos con la aplicación de enmiendas fueron superiores en los suelos contaminados comparados con los porcentajes logrados en los suelos sin contaminar, lo que le permitió asemejarse o superar la abundancia total del tratamiento de suelo sin contaminar y sin aplicación de enmiendas.

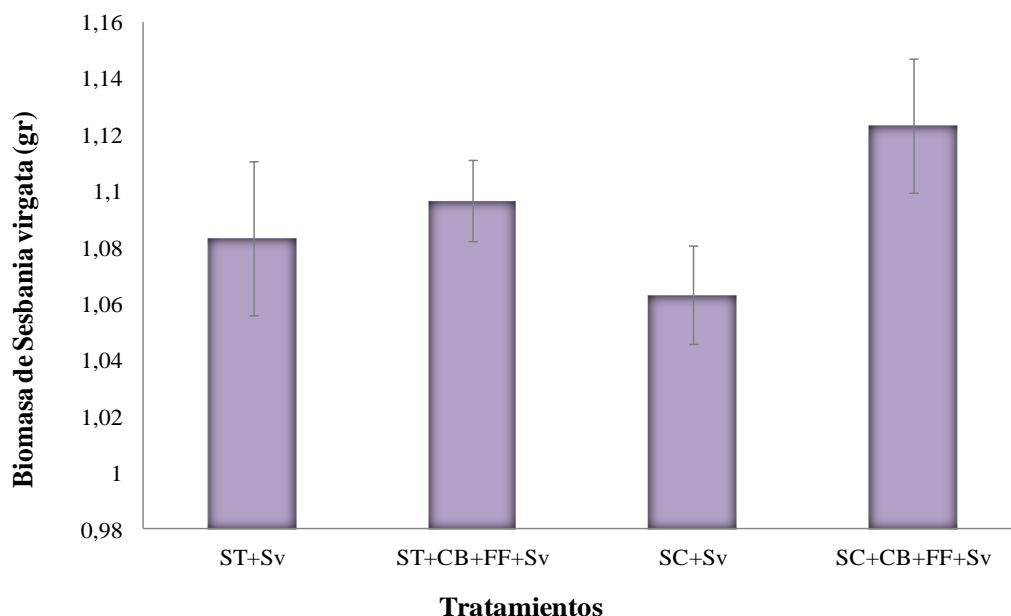


Figura 5.3.b.2: Biomasa promedio total de *S. virgata* obtenida para cada tratamiento. Los datos están expresados como promedios. D.S. ST = suelo sin contaminar, CB = compost de biosólido, FF = fertilizante fosfatado, Sv = *Sesbania virgata*, SC = suelo contaminado.

Según se observa en la Figura 5.3.b.2, y al relacionar el número total de nematodos con la biomasa lograda en las plantas de *Sesbania virgata*, se encontró que en los tratamientos de suelo contaminado donde se aplicaron ambas estrategias de remediación, la biomasa vegetal y la abundancia total de nematodos se incrementaron. El coeficiente de esta correlación es de 0.84, pero sin diferencias significativas, lo cual podría deberse a la alta dispersión de los datos.

Al estimar la estructura de la comunidad de nematodos, en general se observó que la representación proporcional de cada grupo trófico en los distintos tratamientos mostró una mayor proporción de bacteriófagos, seguido de fitófagos en comparación con los dos grupos restantes (Figura 5.3.b.3).

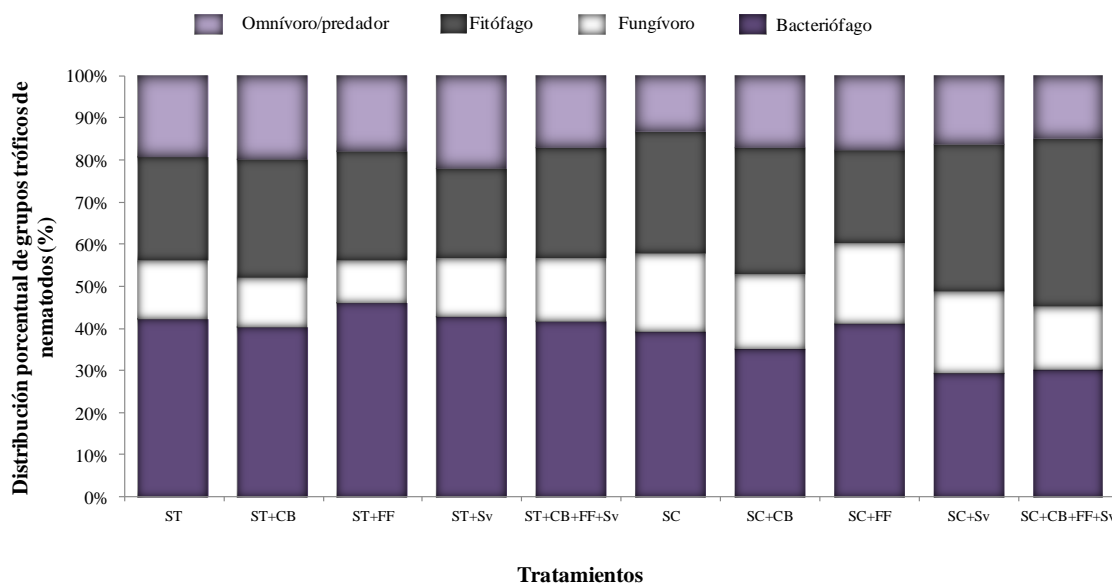


Figura 5.3.b.3: Distribución proporcional de los grupos tróficos de Nematodos según los distintos tratamientos de suelo. ST = suelo sin contaminar, CB = compost de biosólido, FF = fertilizante fosfatado, Sv: *Sesbania virgata*, SC = suelo contaminado.

Sin embargo, en los tratamientos suelo contaminado con implementación de fitorremediación y suelo contaminado con aplicación de ambas estrategias de remediación (enmiendas y fitorremediación), se observó que la proporción de grupos tróficos estuvo más representada por los fitófagos, ya que fueron los más abundantes en relación a los demás grupos y en particular superaron la abundancia de los bacteriófagos.

En la Figura 5.3.b.4 se observa la distribución proporcional de nematodos en cada tratamiento, relativizada a la proporción de individuos del tratamiento control. Se observó que la proporción de individuos fungívoros fue mayor en los tratamientos de suelo contaminado con y sin aplicación de estrategias de remediación, en comparación con los del suelo sin contaminar. El mismo patrón de aumento siguieron los individuos fitófagos, exceptuando el tratamiento SC+FF.

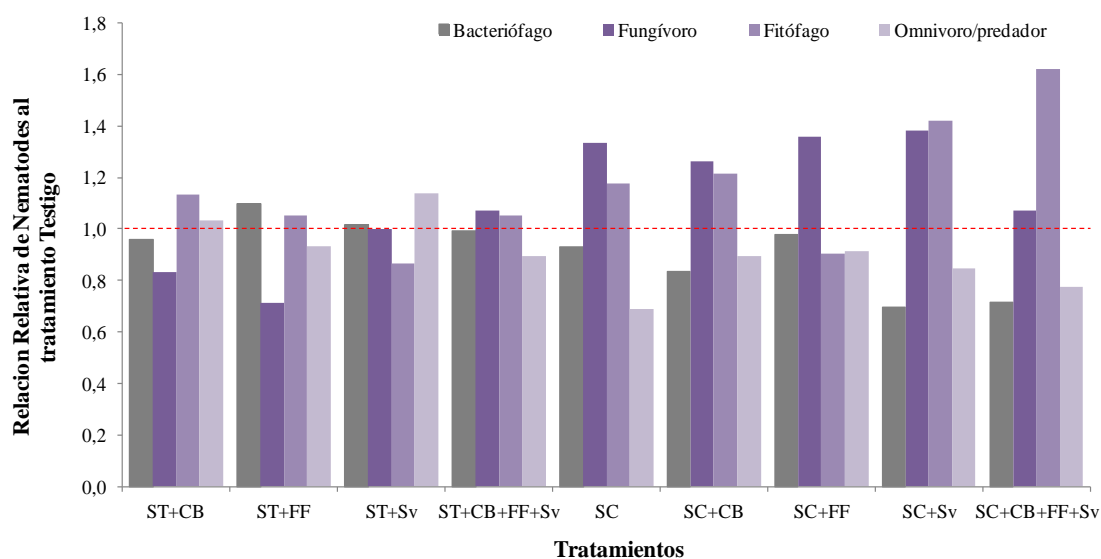


Figura 5.3.b.4: Distribución proporcional de nematodos en cada tratamiento, relativa al tratamiento de suelo sin contaminar. Se indica como 1 el valor del suelo sin contaminar. ST = suelo sin contaminar, CB = compost de biosólido, FF = fertilizante fosfatado, Sv = *Sesbania virgata*, SC = suelo contaminado.

### 5.3.b.1. Índices ecológicos

Los índices ecológicos pueden utilizarse para evaluar la estructura y composición de la comunidad de nematodos. Los valores de diversidad y dominancia de grupos tróficos en función de los distintos tratamientos se presentan en el Cuadro 5.3.b.1. En general, pudo observarse que los valores del Índice de Diversidad Trófica ( $H'$ ), de Dominancia ( $\lambda$ ) y de Equidad ( $J'$ ) de la comunidad de nematodos, fueron similares en el suelo contaminado y en el suelo sin contaminar. En cuanto al Índice  $H'$ , puede decirse que la implementación, en el suelo contaminado, de las estrategias de remediación por separado (SC+CB, SC+FF y SC+Sv), la diversidad de grupos tróficos fue ligeramente superior a la obtenida en el suelo sin contaminar (ST+CB, ST+FF y ST+Sv).

Cuadro 5.3.b.1: Índices ecológicos y relaciones entre grupos tróficos de nematodos, calculados para cada uno de los tratamientos estudiados.

Tratamientos	Diversidad de Shannon ( $H'$ )	Dominancia de Simpson ( $\lambda$ )	Equidad ( $J'$ )	Relación NCR	Relación HERB
ST	1,303	0,294	0,940	0,750	2,270
ST+CB	1,295	0,295	0,934	0,776	1,857
ST+FF	1,246	0,322	0,899	0,821	2,154
ST+Sv	1,301	0,296	0,939	0,753	2,656
ST+CB+FF+Sv	1,303	0,294	0,940	0,735	2,179
SC	1,308	0,289	0,944	0,676	1,989
SC+CB	1,339	0,274	0,966	0,665	1,756
SC+FF	1,322	0,285	0,954	0,683	2,687
SC+Sv	1,341	0,273	0,967	0,603	1,390
SC+CB+FF+Sv	1,297	0,295	0,935	0,667	1,125

Estos resultados podrían complementarse con los datos obtenidos del cálculo de la Dominancia Trófica ( $\lambda$ ) y de la Equidad ( $J'$ ), los cuales mostraron que en el suelo contaminado, la aplicación de enmienda orgánica y de *Sesbania virgata* (SC+CB y SC+Sv) logró una menor dominancia, y consecuentemente una mayor equidad entre grupos tróficos. Por otro lado, también pudo observarse, que la aplicación conjunta de estrategias de remediación (SC+CB+FF+Sv) favoreció la dominancia de fitófagos con respecto a los otros tratamientos de suelo contaminado (Figura 5.3.b.3).

Al observar los valores de la relación entre bacteriófagos y fungívoros (NCR), presentados en el Cuadro 5.3.b.1, se pudo identificar que en los tratamientos de suelo contaminado, y en particular en el tratamiento SC+Sv, la ruta de descomposición de la materia orgánica es llevada a cabo principalmente por hongos (Figura 5.3.b.2). Por otro lado, en el caso de la relación HERB, se observó que la contaminación del suelo aumentó la herbivoría, a excepción del tratamiento con aplicación de fertilizante fosfatado (SC+FF). Los valores más bajos de esta relación se observaron en los tratamientos de suelo contaminado donde estaba presente la especie *Sesbania virgata* (SC+Sv y SC+CB+FF+Sv).

### 5.3.c. Experimento de extracción y cuantificación de glomalina

En la Figura 5.3.c.1 se puede observar el contenido del pool de glomalina fácilmente extraíble (GFE) en función de los tratamientos de suelo. Según lo observado en la figura, la presencia de metales pesados, redujo los contenidos de GFE con respecto a los tratamientos de suelo sin contaminar (Cuadro 5.3.c.1, (contraste 1)). Tal como se observó en los dos experimentos anteriores, donde se evaluaron la actividad total del suelo y la abundancia total de nematodos, el menor contenido de GFE también fue observado en el tratamiento de suelo contaminado sin aplicación de estrategias de remediación (SC).

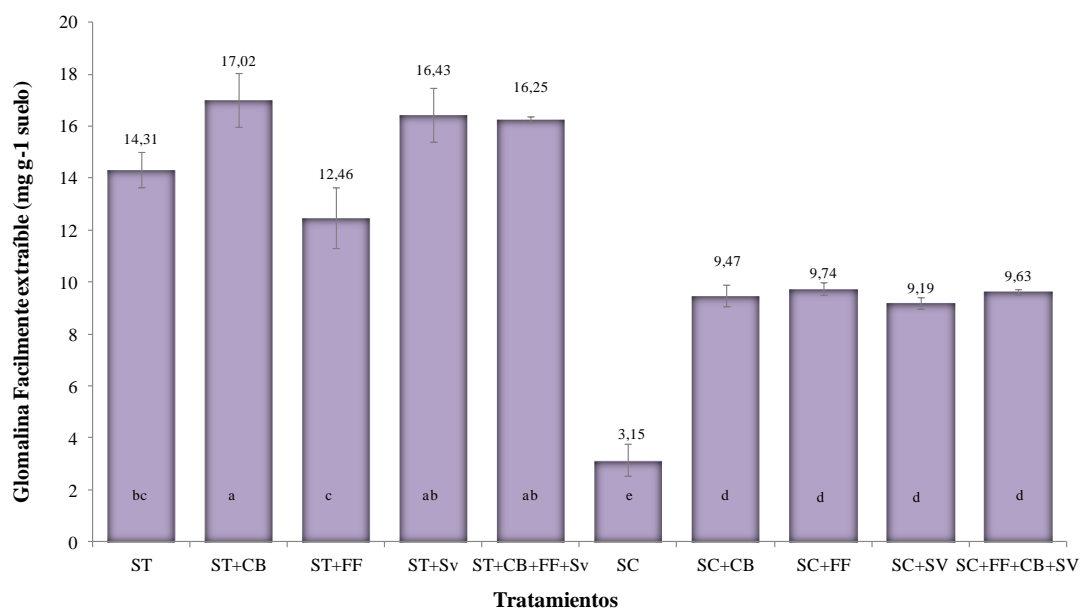


Figura 5.3.c.1: Contenido de Glomalina Fácilmente Extraíble (GFE) en relación a la contaminación y a la remediación del suelo. Los números indican los valores promedios de cada tratamiento. Las líneas verticales indican el error estándar y las letras distintas las diferencias significativas entre tratamientos. ST = suelo sin contaminar, CB = compost de biosólido, FF = fertilizante fosfatado, Sv = *Sesbania virgata*, SC = suelo contaminado.

Por otro lado, se observó que en el suelo sin contaminar, con compost y *Sesbania virgata*, tanto solas como en conjunto, incrementó significativamente el contenido de la glicoproteína en el suelo con respecto a la aplicación de la enmienda fosforada (Cuadro 5.3.c.1, (contraste 2)). En cambio, en el suelo contaminado, a pesar de que la aplicación de estrategias de remediación aumentó significativamente el contenido de la GFE con respecto a la no aplicación, no se observó diferencia entre los distintos tipos de estrategias utilizadas (Figura 5.3.c.1 y Cuadro 5.3.c.1, (contraste 2)).



Cuadro 5.3.c.1: Análisis de ANOVA, valores p del arreglo factorial de los tratamientos y resultados de los contrastes entre los mismos para probar los efectos de la contaminación y enmiendas en la producción de glomalina fácilmente extraíble.

<b>ANOVA (valores de p)</b>	<b>Glomalina Fácilmente Extraíble</b>
Contaminación	< 0,0001
Enmiendas	< 0,001
Contaminación x Enmiendas	0,0027
<b>Contrastes</b>	
<b>1. Contaminación x Enmiendas</b>	
ST vs SC	< 0,0001
ST+CB vs SC+CB	< 0,0001
ST+FF vs SC+FF	0,0234
ST+Sv vs SC+Sv	<0,0001
ST+CB+FF+Sv vs SC+CB+FF+Sv	< 0,0001
<b>2. Enmiendas x Contaminación</b>	
SC vs SC+enmiendas	< 0,0001
ST+CB & ST+CB+FF+Sv vs ST & ST+FF & ST+Sv	0,0160
ST+Sv & ST+CB+FF+Sv vs ST & ST+CB & ST+FF	0,0383

La aplicación de estrategias de remediación incrementó la cantidad de GFE del suelo, y además según se muestra en la Figura 5.3.c.2, esta aplicación también disminuyó el contenido biodisponible de metales pesados. En general, existió una ligera relación inversa entre el contenido de metales pesados biodisponibles y el contenido fácilmente extraíble de glomalina.

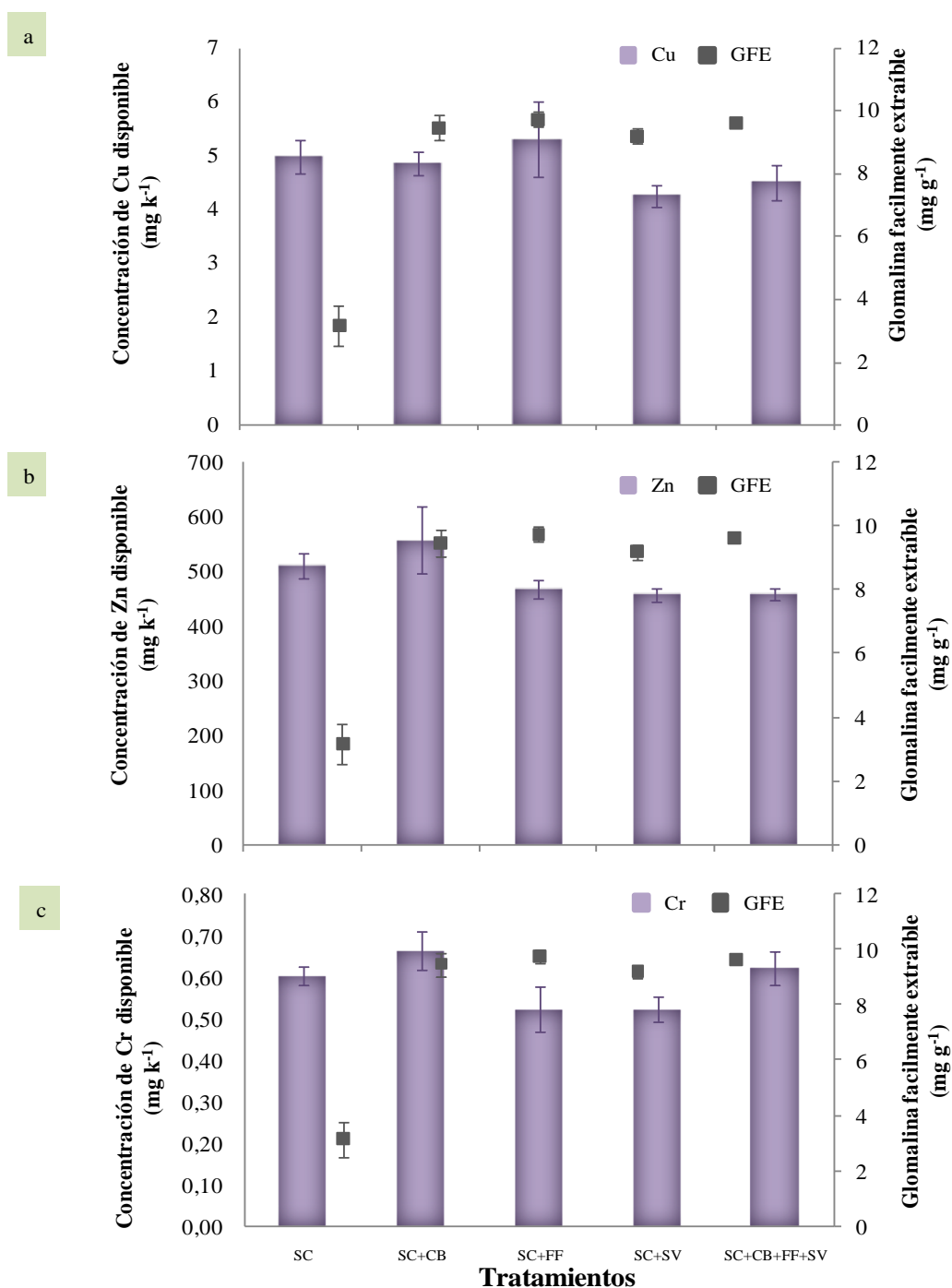


Figura 5.3.c.2: Concentración de MP biodisponibles y concentración de Glomalina Fácilmente Extraíble (GFE) en función a las estrategias de remediación utilizadas. Las líneas verticales indican el error estándar. SC = suelo contaminado, CB = compost de biosólido, FF = fertilizante fosfatado, Sv = *Sesbania virgata*.

El contenido total de glomalina (GT), disminuyó significativamente con la contaminación del suelo, y con la aplicación de estrategias de remediación aumentó, aunque siempre por debajo del valor del suelo sin contaminar ( $p < 0.001$ , Figura 5.3.c.3). Al igual que con la glomalina fácilmente extraíble, el mayor contenido de GT ocurrió en los tratamientos sin contaminación, y el mínimo contenido se observó en el tratamiento de suelo contaminado sin aplicación de estrategias de remediación.

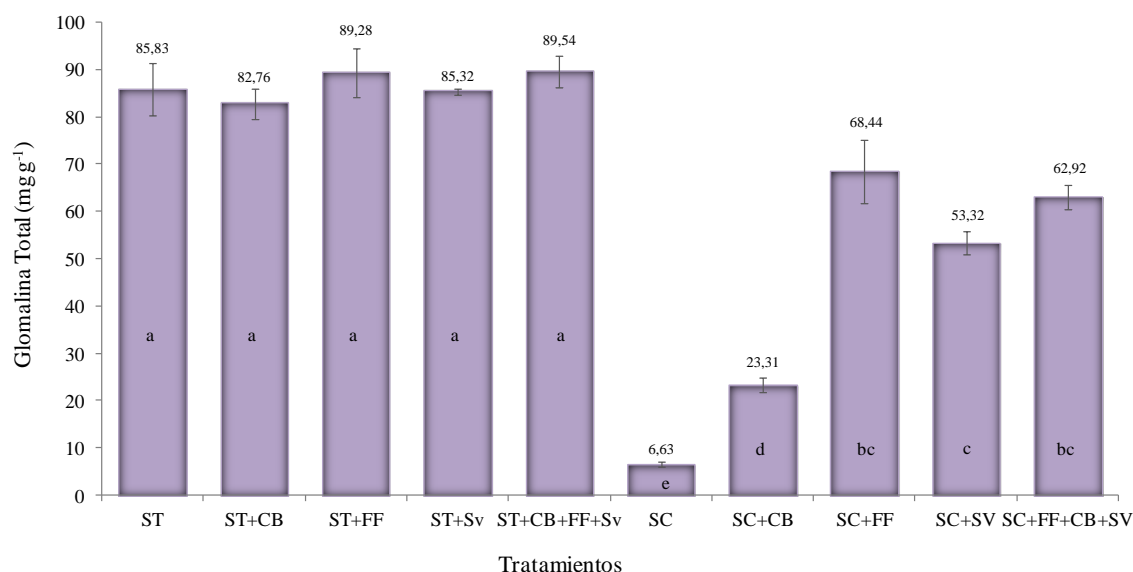


Figura 5.3.c.3: Contenido total de Glomalina (GT) en relación a la contaminación y a la remediación del suelo. Los números indican valores promedios de cada tratamiento. Las líneas verticales indican el error estándar y las letras distintas las diferencias significativas entre tratamientos. ST = suelo sin contaminar, CB = compost de biosólido, FF = fertilizante fosfatado, Sv = *Sesbania virgata*, SC = suelo contaminado.

Según lo mostrado en la Figura 5.3.c.3, en el suelo contaminado, la aplicación de estrategias de remediación aumentó significativamente el contenido de la GT con respecto a la no aplicación, observando diferencias entre los distintos tipos de estrategias utilizadas ( $p=0.05$ ).

## 5.4. DISCUSION

### 5.4.a. Experimento de liberación de C-CO<sub>2</sub> por microorganismos

Según Wang et al. (2007) la actividad de los microorganismos del suelo se encuentra estrechamente relacionada con la fertilidad del mismo y con la calidad ambiental. Esta afirmación podría ser la explicación de la marcada disminución observada en la liberación de C-CO<sub>2</sub> para el tratamiento SC, así como al aumento de la misma, percibido en los tratamientos con aplicación de enmiendas (Figura 5.3.a.1, Cuadro 5.3.a.1). Según diferentes autores (Albiach et al. 2000; Pérez de Mora et al. 2006), estos mayores valores en la respiración indican incrementos en actividad metabólica de la biota del suelo y, en general, se registran en los tratamientos con compost sólo y en compañía con fertilizantes inorgánicos. Esto podría ser atribuible al hecho que estas enmiendas aportan al suelo una considerable cantidad de materia orgánica, la cual puede estar fácilmente disponible y actuar como fuente de energía para los microorganismos del suelo.

En cuanto al máximo valor de C-CO<sub>2</sub> observado en el suelo contaminado con la aplicación de ambas enmiendas, y según lo encontrado en un trabajo previo (Branzini et al. 2009), esta aplicación en conjunto logró inmovilizar al Cu y al Zn, dejándolos menos disponibles para la biota, traduciéndose en el aumento de la actividad biológica observada en este trabajo.

En particular, la disminución en la biodisponibilidad de Cu con la aplicación de enmiendas orgánicas (Figura 5.3.b.2(a)) podría deberse a que los compost maduros presentan altas proporciones de materia orgánica humificada, cumpliendo un rol fundamental en el control de la adsorción de MP en el suelo. Dado que el Cu es el metal que se asocia preferencialmente con la fracción orgánica (Espinosa et al. 2011), queda menos disponible (Tordoff et al. 2000; Dragovic et al. 2008). El porcentaje de materia orgánica humificada del compost de biosólido utilizado en este ensayo, varió entre 86-87.4%, lo que sugiere que el mencionado proceso haya ocurrido. La disminución en la disponibilidad de Zn y Cr con el fertilizante inorgánico, podría acreditarse a la precipitación de complejos metal-fosfato (Basta et al. 2001).

#### **5.4.b. Experimento de extracción, cuantificación e identificación de nematodos de vida libre**

La contaminación del suelo con MP causó un efecto negativo en la microbiota del mismo (Figura 5.3.b.1) (Navas et al. 2010). En tal sentido, la disminución en la abundancia total de nematodos podría afectar el funcionamiento del suelo, ya que podría disminuir la regulación en el ciclado de nutrientes por parte de estos. Lo mismo fue hallado por Park et al. (2011), quienes observaron que la abundancia total, así como la riqueza y diversidad de la comunidad de nematodos fue menor en un suelo con altas concentraciones de Cd, Pb, Zn y Ni, en comparación con un suelo sin contaminación, sugiriendo un efecto adverso en la salud y funcionalidad del suelo.

Debido a que no se encontró relación significativa entre la abundancia total de nematodos y cada uno de los MP, el efecto determinante en la disminución registrada puede deberse a la presencia simultánea de los tres MP. Este resultado coincidió con el resultado obtenido por Ekschmitt y Korthals (2006), quienes indicaron que los nematodos, en general, no exhiben resistencia a múltiples contaminantes que se encuentran en simultáneo, sino que más bien, presentan sensibilidad frente a esta condición. No obstante, cabe aclarar que la disminución observada en nuestro trabajo no fue suficiente para eliminar la biomasa de nematodos en su totalidad, por lo que ciertos nematodos presentan adaptación a esas condiciones que les permite tolerar ciertos niveles o rangos de contaminación por MP (Arnedo Herrera 2007). Por ejemplo, diferentes autores, detectaron la presencia de fitoquelatinas derivadas de glutatión en ciertas especies de nematodos. Estos péptidos son cruciales para la tolerancia del nematodo a los metales pesados como cadmio, mercurio y arsénico (Clemens et al. 2001; Vatamaniuk et al. 2001).

En concordancia con los resultados obtenidos en el experimento precedente, en el cual la actividad biológica del suelo aumentó con la aplicación de enmiendas, en la Figura 5.3.b.1 también se demostró el efecto positivo que tienen las prácticas remediadoras de suelo; se observó un incremento en el número de individuos una vez que se aplicaron prácticas remediadoras del suelo. En este experimento, además se encontró tendencia al aumento en la abundancia total de nematodos con el aumento en la biomasa de las plantas de *Sesbania virgata* (Figura 5.3.b.2). Según Arnedo Herrera (2007), en un experimento realizado con plantas acumuladoras de metales, la biomasa vegetal incrementó con la presencia de nematodos, lo que podría indicar que las plantas contaban con una mayor disponibilidad de nutrientes.

Asimismo, como se mostró Figura 5.3.b.3, la variación en la proporción de grupos tróficos de nematodos también es un parámetro que varía en función del estado en la calidad del suelo (contaminación y remediación). Esta variación podría explicarse

por la alta sensibilidad que las poblaciones de nematodos presentan frente a las condiciones del medio y en particular a la contaminación (Neher 2001). La respuesta de los nematodos a condiciones adversas incluye la alteración de su distribución, su agregación, cambio en la proporción de sexo para mejorar las posibilidades de sobrevivencia, muchos otros mantienen su estado juvenil, más resistente, o pasan a una quiescencia temporaria (Van voorhies y Ward 1999; McSorley 2003). En un estudio llevado a cabo por Bardgett et al. (1999), se reportó un aumento en la proporción de nematodos bacteriófagos y predadores cuando los niveles de contaminación con Cu, Cr y As eran altos, mientras que en situaciones de baja contaminación por estos metales, aumenta la predominancia de los nematodos fitófagos. Dado que en nuestro experimento se encontró mayor proporción de fitófagos en los tratamientos con suelo contaminado con respecto al ST (Figura 5.3.b.4), se estima que los niveles de contaminación no fueron lo suficientemente elevados como para favorecer la proliferación de bacteriófagos y predadores. Por ello, el impacto de los MP, en las concentraciones utilizadas en este experimento, en la comunidad de nematodos fue relativamente bajo.

#### 5.4.b.1. Índices ecológicos

Los valores de los Índices y relaciones calculados (Cuadro 5.3.b.1), mostraron similar diversidad entre suelo contaminado y sin contaminar. Sin embargo, la aplicación de las diferentes estrategias de remediación, aumentó la diversidad trófica, demostrando su efecto positivo sobre la estructura trófica de nematodos del suelo. A pesar que Chen et al. (2009) mostraron que el índice de diversidad puede ser una importante herramienta para determinar el impacto de los contaminantes en la comunidad de nematodos, en el presente trabajo, este índice también pudo ser útil para demostrar el efecto positivo de las distintas estrategias de remediación sobre la funcionalidad del suelo.

Según muestra el Cuadro 5.3.b.1, los valores más bajos de NCR en los tratamientos con suelo contaminado, reflejan la dominancia de nematodos fungívoros, pudiendo indicar poblaciones de hongos abundantes. Este decrecimiento en la dominancia de bacteriófagos e incremento en la abundancia (Figura 5.3.b.4) y actividad de fungívoros, en general podría observarse bajo condiciones de acidez o bajo condiciones de estrés causado por metales pesados (Wasilewska 1997a; Bongers y Bongers 1998). En particular, bajo estrés generado por Zn, Cr, Mn, Ni, Co, y Cu, se produce un incremento significativo en los nematodos que se alimentan de hongos.

A su vez, la menor relación HERB observada para los tratamientos de suelo contaminado con respecto a los tratamientos de suelo sin contaminar (Cuadro 5.3.b.1), y en particular de los tratamientos con *Sesbania virgata*, estaría indicando que la utilización de estrategias de remediación modifica la función del suelo, ya que la liberación de nutrientes sería llevada principalmente por fitófagos en lugar de bacterias y hongos. Según otros autores, la actividad de alimentación de los fitófagos (heterótrofos), libera nutrientes al suelo, pero la tasa de liberación es diferente según los ecosistemas y que organismo lo lleva a cabo. Además, los fitófagos proveen de energía a los niveles superiores de la cadena trófica, ya que derivan la energía solar acumulada por las plantas a estos niveles. En particular, la descomposición de los tejidos muertos, llevada a cabo por bacterias y hongos, libera nutrientes a una tasa más baja que la causada solamente por la alimentación de fitófagos, los cuales proporcionan un rápido flujo de materia y energía de autótrofos a heterótrofos (Odum y Biever 1984;

Wasilewska 1997). Según Rapport et al. (1995), y en función a esta afirmación, la contaminación forzó al ecosistema a un estadio temprano de sucesión ecológica, y la remediación del suelo recuperó las funciones del mismo.

#### **5.4.c. Experimento de extracción y cuantificación de glomalina**

La detección de bajos contenidos de glomalina (GFE y GT), en los tratamientos contaminados, demostraron, al igual que en los experimentos anteriores, que la contaminación del suelo con MP ejerce un impacto en la funcionalidad del suelo. Esta reducción en la síntesis de glomalina concuerda con los resultados obtenidos por Cavalcanti et al. (2010), quienes indicaron que las concentraciones de glomalina fueron inferiores y hasta no detectables en suelos impactados por actividad minera, en comparación con suelos de bosques no impactados.

El incremento en el contenido de glomalina, observado en los tratamientos de suelo contaminado con aplicación de estrategias de remediación, estuvo acompañado con una disminución de alrededor del 10% en el contenido biodisponible de los tres MP estudiados (Figura 5.3.c.2). Estos resultados coincidieron con los de González-Chávez et al. (2004), quienes reportaron que la glomalina se involucra en el secuestro de diversos metales pesados en el suelo. En tal sentido, estudios más recientes mostraron evidencias que una glicoproteína puede contribuir a inmovilizar y estabilizar el Cu en particular, ya que puede secuestrarlo en su molécula, favoreciendo de esta manera, los procesos de fitoestabilización del mismo (Seguel et al. 2009; Cornejo et al. 2013).

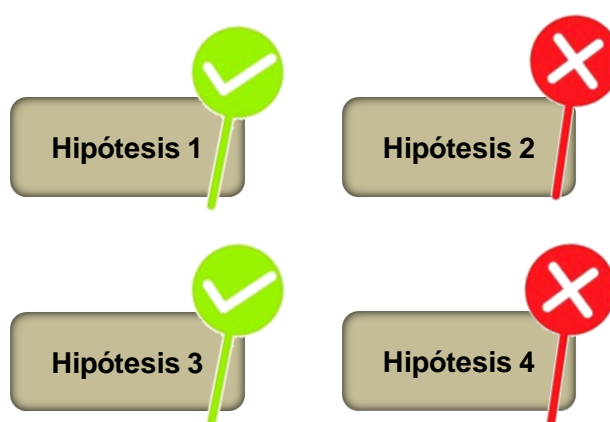
La aplicación de estrategias de remediación al suelo contaminado aumentó significativamente el contenido de ambos pools de glomalina, por la reducción de MP. Consecuentemente, la complementación entre el uso de enmiendas y síntesis de glomalina, podría ser una herramienta útil para considerar en procesos de remediación de suelos, y en particular, en procesos de fitoestabilización (Alguacil et al. 2011; Singh 2012).

### **5.5. CONCLUSIONES**

Tanto la actividad biológica total, la comunidad de nematodos como la producción de glomalina, fueron parámetros sensibles a las diferentes condiciones de la calidad del suelo, contribuyendo al entendimiento del efecto de los MP sobre el funcionamiento del suelo. Esto, además mostró la gran versatilidad que presentaron los parámetros elegidos.

La aplicación de estrategias químicas al suelo contaminado logró incrementar la producción total CO<sub>2</sub>, asemejándose a las condiciones originales del suelo. Por otro lado, la aplicación de estrategias químicas y biológicas de remediación, aumentó la abundancia total de nematodos y la diversidad trófica, recuperando la estructura funcional de la comunidad de nematodos. Por último, la remediación con ambas estrategias, también incrementó la producción de los diferentes pools de glomalina, y produjo una disminución significativa en las concentraciones de MP. En función a los resultados obtenidos bajo las condiciones de estos experimentos, se concluyó que las estrategias de remediación consideradas ayudan a recuperar la biota del suelo, siendo capaces de ser utilizadas para la recuperación y restauración de las funciones de un suelo contaminado.

Además, la activa relación de los nematodos con las bacterias del suelo y con los entornos radicales de las plantas, permitiría pensar en la potencial incorporación de estos indicadores a un sistema de remediación biológica integrado que puedan traducirse en mejora de la eficiencia de remediación de suelos contaminados, con una mejora potencial en los servicios ecosistémicos que pueden brindar los suelos contaminados.



Esquema 5.5: Esquema resumen del rechazo o no rechazo de las hipótesis planteadas al inicio del capítulo.

## **Capítulo 6. Discusión General**



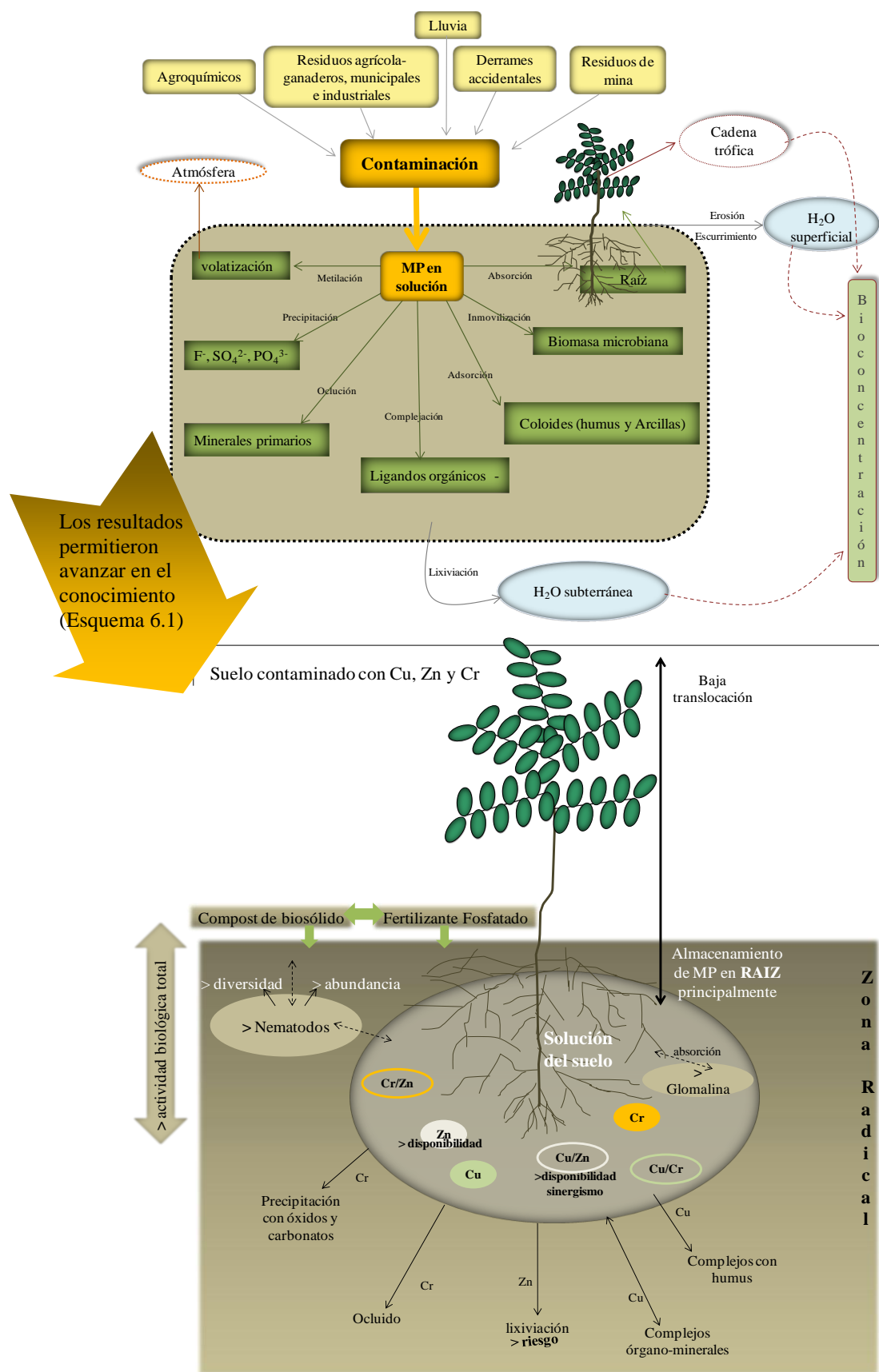
El uso sustentable de los suelos debe tener en cuenta que las actividades productivas pueden ocasionar efectos adversos por contaminación antrópica con metales pesados. Anticiparse y evitarlo es requisito insoslayable. Sin embargo, el uso del suelo, no siempre tiene como premisa la sustentabilidad del mismo. Por eso, los impactos negativos requieren adecuadas metodologías de remediación para recuperar y mantener la calidad del mismo. En particular, estabilizar los elementos metálicos contaminantes en el suelo, conlleva a reducir la dispersión de la contaminación hacia otros medios del ecosistema, lo que a su vez tiende a evitar efectos irreversibles en los suelos que afectan el derecho humano, consagrado en la legislación, a vivir y disfrutar un ambiente sano.

*"Todos los habitantes gozan del derecho a un ambiente sano, equilibrado, apto para el desarrollo humano y para que las actividades productivas satisfagan las necesidades presentes sin comprometer las de las generaciones futuras; y tienen el deber de preservarlo (...)"*

*Artículo 41 de la Constitución Nacional*

Consecuentemente, es indiscutible que el derecho a un ambiente equilibrado o sano, constituye un derecho fundamental de la persona y por ello, debe ser estrictamente respetado. Aún cuando se ha avanzado significativamente en el aspecto legislativo, no es suficiente el simple reconocimiento de este derecho, sino asegurar su disfrute, con garantías diversas y efectivas.

En virtud a lo mencionado, se realizaron diferentes experimentos los cuales contribuyeron a responder las inquietudes planteadas, y arribar a conclusiones con soluciones eficientes, que nos permitiría incluir una solución ambiental, pero con interés social y económico. Se demuestra que el abordaje de la problemática con herramientas químicas y biológicas es eficiente para remediar los suelos contaminados con Cu, Zn y Cr, bajo las condiciones de este estudio. Sin embargo, cabe destacar que luego de la implementación de estrategias de remediación, las propiedades del suelo y las condiciones de las plantas deben ser monitoreadas en el tiempo, considerando que el suelo es un sistema vivo y dinámico, y por lo tanto la estabilización de los elementos metálicos no es estática en el tiempo. Consecuentemente, el monitoreo de las propiedades del suelo puede ayudar a eficientizar las estrategias utilizadas, y lograr una remediación sostenible en el tiempo.



Esquema 6.1: Evolución de las propiedades químicas y biológicas del suelo contaminado con MP una vez que se aplicaron las estrategias de remediación. Comparación entre el esquema teórico presentado en el Capítulo 1 y lo encontrado en esta tesis.

La toxicidad de los MP sobre las especies de *Sesbania* nativas se evidenció en el **bioensayo de germinación**. Las especies de *Sesbania* fueron capaces de germinar, tolerando altos contenidos de MP, e igualando resultados obtenidos con otras especies de *Sesbania* no nativas, según bibliografía internacional.

Durante el desarrollo del cultivo de *S. virgata*, se encontró que la **combinación binaria** de metales en el suelo afectó la absorción de cada metal, los factores de translocación y bioconcentración, así como la biomasa total de la planta, evidenciando la existencia de interacciones sinérgicas y/o antagónicas entre ellas. Un ejemplo de ello, es que la combinación de Cu/Zn a altas concentraciones aumentó la disponibilidad de cada uno de ellos por competencia, por lo cual fueron más absorbidos por las plantas y esto generó la máxima reducción de la biomasa total de *S. virgata* con respecto a la presencia individual de cada metal.

Mediante el cultivo en hidroponía se evidenció el importante papel de la matriz de suelo sobre la retención de los MP. Cuando el suelo no constituye el medio de cultivo, se incrementó la fracción biodisponible de MP siendo mayor la absorción de los mismos por la planta en general y especialmente en la parte aérea. En cultivo con suelo, la acumulación de MP en *S. virgata* fue menor, mostrando la capacidad del suelo para atenuar naturalmente dicha contaminación.

Los ensayos en suelo e hidroponía manifestaron la capacidad de la especie *Sesbania virgata* para tolerar y estabilizar altas concentraciones de Cu, Zn y Cr en suelos, así como de tolerarlos y acumularlos en cultivo hidropónico, actuando como una eficaz especie **fitoestabilizadora de MP en suelo**.

La evaluación indirecta del riesgo que cada uno de los MP tiene en el ambiente, a través del procedimiento de **extracción secuencial y análisis de transmisión electrónica** de MP, ayudaron a comprender que la movilidad aparente y la potencial disponibilidad en el suelo de cada elemento en mezcla ternaria fue  $Zn > Cu > Cr$ , siendo el Zn el elemento con mayor riesgo potencial para la biota. El cultivo de *Sesbania* en el suelo, conjuntamente con la aplicación de enmiendas favoreció la inmovilización del Cu y Cr. La fitorremediación por sí sola es capaz de disminuir significativamente el contenido biodisponible del Zn.

La combinación de estrategias es útil en un sistema multi-contaminado, teniendo en cuenta que cada metal reacciona de diferente manera frente a las estrategias utilizadas.

Considerando que las funciones del suelo son múltiples, el empleo de tres indicadores biológicos (**respiración, estructura de la comunidad de nematodos y concentración de glomalina**), permitió evaluar la recuperación de las condiciones biológicas del suelo.

El uso de fertilizantes logró incrementar la producción total CO<sub>2</sub>, asemejándose a las condiciones originales del suelo. Además, la fitorremediación asistida con uso de fosforo aumentó la abundancia total de nematodos y la diversidad trófica, recuperando la estructura funcional de la comunidad de nematodos; así como también, incrementó la producción de los diferentes pools de glomalina. Los parámetros seleccionados como indicadores abarcaron distintos niveles de biota, por lo cual sus cambios en función a la calidad del suelo, permitieron realizar una evaluación integral de la calidad biológica del suelo, desde la actividad total, hasta lo más específico como la estructura trófica de los nematodos, y la concentración de glomalina.

La evaluación de la condición actual del suelo puede ayudar a monitorear la sustentabilidad de los servicios que provee el mismo. De hecho, la utilización de estos indicadores biológicos es útil para corroborar que las estrategias químicas y biológicas recuperan las funciones del suelo luego de una contaminación dentro de la cual se incluye la actividad total, la regulación del ciclado de nutrientes, así como la estabilización de la estructura del suelo.

### **Principales contribuciones de la tesis al avance del conocimiento**

Cada capítulo contiene respuestas consistentes que permiten responder incertidumbres planteadas al inicio de la tesis. Las respuestas enriquecen el conocimiento actual, acerca de una estrategia novedosa en la Argentina, que es el uso de la fitorremediación asistida, en un suelo Hapludol de la Región Pampeana, contaminado con metales pesados.

1.- La especies arbustivas de *Sesbania* nativas de la Región Pampeana, son aptas para fitoestabilizar suelos y aguas contaminadas con Cu, Zn y Cr, y obtener una vegetación auto-sostenible en zonas multi-contaminadas con Cu, Zn y Cr, ya sea en mezclas binarias y ternarias de los mismos.

2.- La implementación combinada de estrategias químicas y biológicas en el suelo contaminado con MP, es necesaria para complementar la inmovilización in situ. Esto resulta del hecho que la aplicación de enmiendas, además de favorecer la inmovilización de los MP por parte de las plantas pioneras, facilita el establecimiento de las mismas.

3.- Con el uso de enmiendas orgánicas e inorgánicas, así como la implantación de especies vegetales es posible alcanzar un equilibrio biológico similar al de un suelo prístino.

4.- Un aspecto importante aportado por esta tesis, es la visión integral que se obtuvo del sistema suelo, ya que se consideraron las propiedades químicas y biológicas del suelo contaminado y con estrategias de remediación, incluyendo la interacción entre los MP, el suelo, la planta y los microorganismos en distintos niveles.

## Estudios futuros para enriquecer el conocimiento

Si bien los resultados de la tesis evidenciaron la evolución de la calidad química y biológica de un suelo contaminado, con la utilización de más de una estrategia de remediación, teniendo en cuenta que los terrenos contaminados pueden ser destinados a un uso ornamental, para fibras, forestación y no para agricultura, algunas incertidumbres quedaron pendientes para ser desarrolladas a futuro:

### 1 *“Fijación simbiótica de N atmosférico”*

Estudiar niveles de afectación a la simbiosis por los metales pesados del suelo incluyendo la aplicación de enmiendas y/o fertilizante fosforado.

### 2 *“Comunidad vegetal nativa apta para remediar suelos”*

En la búsqueda de otras especies nativas tolerantes a los metales pesados, es interesante enfocarse en consorcios de especies que sean aptas para desarrollarse naturalmente en zonas urbanas y periurbanas que estén contaminadas con MP. Como desafío se propone evaluar el efecto de diferentes especies nativas, herbáceas y leñosas en asociación, para restablecer la fertilidad del suelo y a encontrar una nueva sucesión ecológica en ambientes contaminados.

### 3 *“Índice de Calidad de Suelo”*

Evaluar si los diferentes indicadores biológicos estudiados en esta tesis son capaces de ser integrados, en conjunto con parámetros químicos y físicos de calidad de suelo.

### 4 *“Generación de bioenergía a partir de la biomasa leñosa producida por Sesbania durante el proceso de remediación”*

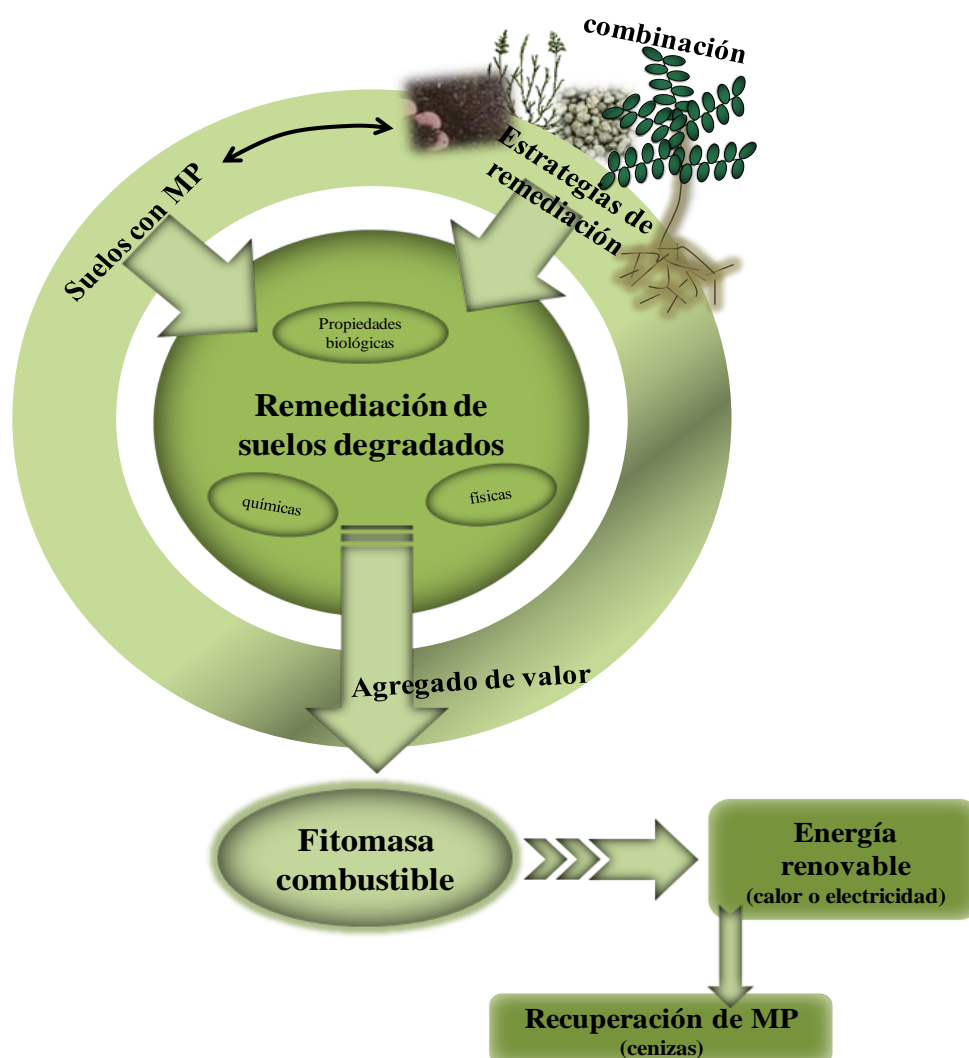
Hasta el presente, los principales destinos de las especies de *Sesbania* nativas de la Argentina estudiadas en esta tesis, son su uso ornamental, o como componente agrícola en la rotación de los cultivos en las épocas lluviosas (Izaguirre 2005). Su uso como fitorremediadora es una alternativa viable. Considerando su rápido crecimiento, y que otras especies del género son utilizadas para la producción de leña y carbón, a partir que de la quema de su biomasa leñosa que produce relativamente poco humo (Naik et al. 2011; Pravin Gonase et al. 2012), un uso alternativo podría ser la generación de bioenergía con la biomasa leñosa derivada de la fitorremediación del suelo.

5

*“Aportes a la legislación vigente”*

Los resultados obtenidos indican que sería apropiado que la legislación reevaluara los límites máximos permisibles de MP en suelos para distinto uso, considerando su presencia simultánea, en forma de mezclas de MP y no individual, tomando en cuenta las interacciones entre los mismos (Ley N° 24.051, Anexo 9).

En el Esquema 6.2 se resumen las posibles líneas de acción, integrando el sistema suelo planta y la valoración energética de las especies vegetales:



Esquema 6.2: Resumen de las posibles líneas de investigación. Recuperación de las propiedades físicas, químicas y biológicas de un suelo contaminado con MP a través de la utilización de estrategias (biológicas y químicas) de remediación. Agregado de valor a esa remediación mediante su utilización para la generación de energía y la recuperación de los MP.

## BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Sabour, M.F. 2007. Chromium in receiving environment in Egypt (Anoverview). EJEAFChe, 6: 2178-2198.
- Abrahams, P.W. 2002. Soils: their implications to human health. Sci. Total Environ., 291:1-32.
- Accioly, A.M.A. y Siqueira, J.O. 2000. Contaminação química e biorremediação do solo. Tópicos em Ciência do Solo (Viçosa), 1: 299-351.
- Adamo, P., Zampella, M., Gianfreda, L., Renella, G., Rutigliano, F.A. y Terribile, T. 2006. Impact of river overflowing on trace element contamination of volcanic soils in south Italy: Part I. Trace element speciation in relation to soil properties. Environ. Pollut., 144: 308-316.
- Adriano, D.C. 2001. Trace elements in terrestrial environments. Biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. Springer, New York, NY, USA, 2nd edition. 866 pp.
- Adriano, D.C., Wenzel, W.W., Vangronsveld, J. y Bolan, N.S. 2004. Role of assisted natural remediation in environmental cleanup. Geoderma, 122: 121-142.
- Agnieszka, J. y Gworek, B. 2012. Chromium, nickel and vanadium mobility in soils derived from fluvioglacial sands. J. Hazar. Mater., 237: 315-322.
- Ajmone-Marsan, F., Biasioli, M., Kralj, T., Greman, H., Davidson, C.M., Hursthouse, A.S., Madrid, L. y Rodrigues, S. 2008. Metals in particle-size fractions of the soils of five European cities. Environ. Pollut., 152: 73-81.
- Akmal, M., Wang, H.Z., Wu, J.J., et al. 2005. Changes in enzymes activity, substrate utilization pattern and diversity of soil microbial communities under cadmium pollution. J. Environ. Sci., 17: 802-807.
- Albiach R., Canet, R., Pomares, F. y Ingelmo, F. 2000. Microbial biomass content and enzymatic activities after the application of organic amendments to a horticultural soil. Bioresource Technol., 75: 43-48.
- Alexander, R. 2001. Field Guide to Compost Use. En: The US Composting Council. USA. 94 pp.
- Alguacil, M.M., Torrecillas, E., Caravaca, F., Fernández, D.A., Azcón, R. y Roldán, A. 2011. The application of an organic amendment modifies the arbuscular mycorrhizal fungal communities colonizing native seedlings grown in a heavy-metal-polluted soil. Soil Biol. Biochem., 43: 1498-1508.
- Ali, N.A., Ater, M., Sunahara, G.I. y Robidoux, P.Y. 2004. Phytotoxicity and bioaccumulation of cooper and chromium using barley (*Hordeum vulgare L.*) in spiked artificial and natural forest soils. Ecotox. Environ. Safe., 57: 363-374.
- Alkorta, I., Aizpurua, A., Riga, P., Albizu, I., Amezaga, I., Garbisu, C. 2003. Soil enzyme activities as biological indicators of soil health. Rev. Environ. Health 18: 65-73.
- Alloway, B.J. 1995. The origins of heavy metals in soils. En: Heavy metals in soils. Ed. Blackie Academic and Professional. 2ª Ed. London, U.K. pp 38-57.
- Alpaslan, B. y Yukselen, M.A. 2001. Remediation of lead contaminated soils by stabilization/solidification. Water, Air Soil Pollut., 133: 253-263.

- Alva, A.K., Huang, B. y Paramasivam, S. 2000. Soil pH affects copper fractionation and phytotoxicity. *Soil Sci. Society. Am. J.*, 64: 955-962.
- Alvarez, R., Díaz, R., Barbero, N., Santanatoglia, O.J. y Blotta, L. 1995. Soil organic carbon, microbial biomass and CO<sub>2</sub>-C production from three tillage systems. *Soil Tillage Res.*, 33: 17-28.
- Álvarez, R., Alconada, M. y Lavado, R.S. 1999. Sewage sludge effects on carbon dioxide-carbon production from a desurfaced soil. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 30: 1861-1866.
- Alvarenga, P., Goncalves, A.P., Fernandes, R.M., de Varennes, A., Vallini, G., Duarte, E. y Cunhaqueda, A.C. 2008. Evaluation of composts and liming materials in the phytostabilization of a mine soil using perennial ryegrass. *Sci. Total Environ.*, 406: 43-56.
- Amir, S., Hafidi, M., Merlina, G. y Revel, J.C. 2005. Sequential extraction of heavy metals during composting of sewage sludge. *Chemosphere*, 59: 801-810.
- Antoniadis, V. y McKinley, J.D. 2003. Measuring heavy metal migration rates in low-permeability soil. *Environ. Chem. Lett.*, 1: 103-106.
- Antoniadis, V., Tsadilas, C.D. y Ashworth, D.J. 2007. Monometal and competitive adsorption of heavy metals by sewage sludge-amended soil. *Chemosphere*, 68: 489-494.
- Astolfi, S., Zuchi, S. y Passera, C. 2004. Effects of cadmium on the metabolic activity of *Avena sativa* plants grown in soil or hydroponic culture. *Biol. Plant*, 48: 413-418.
- Arienzo, M., Adamo, P. y Cozzolino, V. 2004. The potential of *Lolium perenne* for revegetation of contaminated soil from a metallurgical site. *Sci. Total Environ.*, 319: 13-25.
- Arneda-Herrero, B.J. 2007. Producción en masa de nemátodos bacterívoros de vida libre aislados de suelos contaminados con metales pesados, para su utilización en una metodología de remediación biológica integral. Tesis de Doctorado, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile. 200 pp.
- Baker, A. y Smith, R. 1974. Preparation of solution for atomic analysis of Fe, Mn, Zn, Cd, Cu in plant tissue. *Agric. Food Chem.*, 22: 103-107.
- Baker, A.J.M. 1981. Accumulators and excluders strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant Nutr.*, 3: 643-654.
- Baker, L.R., Pierzynski, G.M., Hettiarachchi, G.M., Scheckel K.G. y Newville, M. 2012. Zinc speciation in proximity to phosphate application points in a lead/zinc smelter-contaminated soil. *J. Environ. Qual.*, Technical Reports, 9 pp.
- Balvanera, P. 2012. Los servicios ecosistémicos que ofrecen los bosques tropicales. *Ecosistemas*, 21: 136-147.
- Bardgett, R., Cook, R., Yeats, G. y Denton, C. 1999. The influence of nematodes on below-ground processes in grassland ecosystems. *Plant Soil*, 212: 23-33.
- Basta, N.T. y Sloan, J.J. 1999. Application of alkaline biosolids to acid soils: Changes in solubility and bioavailability of heavy metals. *J. Environ. Qual.*, 28: 633-638.



- Basta, N.T., Grathwohl, R., Snethen, K.L. y Schoroder, J.L. 2001. Chemical immobilization of lead, zinc and cadmium in smelter contaminated soils using biosolids and rock phosphate. *J. Environ. Qual.*, 30: 1222-1230.
- Basta, N.T., Ryan, J.A. y Chaney, R.L. 2005. Trace elements chemistry in residual-treated soil: key concepts and metal bioavailability. *J. Environ. Qual.*, 34: 49-63.
- Barceló, I. 2000. Estudio de la movilidad de Ca, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb y Zn en sedimentos de la presa J.A. Alzate en el Estado de México. Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México. 320 pp.
- Biederman, L.A., Boutton, T.W. y Whisenant, S.G. 2008. Nematode community development early in ecological restoration: The role of organic amendments. *Soil Biol. Biochem.*, 40: 2366-2374.
- Braga, L., Souza, M. y Almeida, T. 2009. Germinacao de sementes de *Enterolobium schomburgkii* (Benth.) submetidas a estresse salino e aplicacao de poliamina. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 11: 63-70.
- Brussaard, L., Pullemanb, M., Ouédraogoc, E., Mandod, A. y Sixe, J. 2007. Soil fauna and soil function in the fabric of the food web. *Pedobiologia*, 50: 447-462.
- Berbara, R.L.L., Souza, F.A. y Fonseca, H.M.A.C. 2006. Fungos Micorrízicos arbusculares: Muito além da nutrição. Pp. 53-88 en: Fernandes, M.S. (Ed.) *Nutrição Mineral de Plantas*. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo (Viçosa).
- Bernal, M.P., Clemente, R., Vazquez, S. y Waljer, D.J. 2007. Aplicación de la fitorremediación a los suelos contaminados por metales pesados en Aznalcólla. *Ecosistemas*, 16: 67-76.
- Bert, V., Lors, Ch., Ponge, J.F., Caron, L., Biaz, A., Dazy, M. y Masfaraud, J.F. 2012. Metal immobilization and soil amendment efficiency at a contaminated sedimentlandfill site: A field study focusing on plants, springtails, and bacteria. *Environ. Pollut.*, 169: 1-11.
- Bolan, N.S. y Duraisamy, V.P. 2003. Role of inorganic and organic soil amendments on immobilization and phytoavailability of heavy metals: a review involving specific case studies. *Aust. J. Soil Res.*, 41: 533-555.
- Bolan, N.S., Adriano, D.C., Duraisamy, P., Mani, A. y Arulmozhiselvan, K. 2003. Immobilization and phytoavailability of cadmium in variable charge soils. I. Effect of Phosphate addition. *Plant Soil*, 250: 83-94.
- Bongers, T. 1990. The Maturity Index: An ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition. *Oecologia*, 83: 14-19.
- Bongers, T. y Bongers, M. 1998. Functional diversity of nematodes. *Applied Soil Ecol.*, 10: 239-251.
- Borie F., Rubio, R., Rouanet, J., Morales, A., Borie, G. y Rojas, C. 2006. Effect of tillage systems on soil characteristics, glomalin and mycorrhizal propagules in a Chilean Ultisol. *Soil Tillage Res.*, 88: 253-261.
- Borůvka, L. y Drábek, O. 2004. Heavy metal distribution between fractions of humic substances in heavily polluted soil. *Plant Soil Environ.*, 50: 339-345.
- Branzini, A., Zubillaga, M.S. y Zubillaga, M.M. 2009. Microbial response to the application of amendments in a contaminated soil with trace elements. *Am. J. Environ. Sci.*, 5: 94-98.

- Brookes, P.C. 1995. Use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biol. Fertil. Soils*, 19: 269-279.
- Brooks, R.R. 1998. Plants that hiperaccumulate heavy metals: their role in phytoremediation, microbiology, archeology, mineral exploration and phytomining. Pp. 380 en Wallingford, Oxon: CAB International (Ed.), UK.
- Brown, A., Martínez Ortiz, U., Acerbi, M. y Corcuera, J. 2006. La situacion ambiental argentina 2005. Pp. 261-277 en Fundación Vida Silvestre Argentina, Buenos Aires, Argentina.
- Cabrera, A.L. 1994. Regiones Fitogeográficas Argentinas. Pp. 85 en ACME SA (Ed.) Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Tomo II (1). Buenos Aires, Argentina.
- Calace, N., Campisi, T., Iacondini, A., Leoni, M., Petronio, B.M. y Pietroletti, M. 2005. Metal-contaminated soil remediation by means of paper mill sludge's addition: chemical and ecotoxicological evaluation. *Environ. Pollut.*, 136: 485-492.
- Calow, P. 1993. Handbook of ecotoxicology. Vol 1. London, England: Blackwell Science Ltd. 478 pp.
- Cao, R.X., Ma, L.Q., Chen, M., Singh, S.P. y Harris, W.G. 2003. Phosphate induced metal immobilization in a contaminated site. *Environ. Pollut.*, 122: 19-28.
- Cao, X., Wahdi, A., Ma, L., Li, B. y Yang, Y. 2009. Immobilization of Zn, Cu, and Pb in contaminated soils using phosphate rock and phosphoric acid. *J. Hazard. Mater.*, 164: 555-564.
- Caravaca, F., Alguacil, M.M., Barea, J.M., Roldan, A. 2005. Survival of inocula and native AM fungi species associated with shrubs in a degraded Mediterranean ecosystem. *Soil Biol. Biochem.*, 37: 227-233.
- Carpena, R.O. y Bernal, M.P. 2007. Claves de la fitorremediación: fitotecnologías para la recuperación de suelos. *Ecosistemas*, 16: 1-3.
- Castaldi, P. y Melis, P. 2004. Growth and yield characteristics and heavy metals content on tomatoes grown in different growing media. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 35: 85-98.
- Castaldi, P., Santona, L. y Melis, P. 2005. Heavy metal immobilization by chemicals amendments in a polluted soil and influence on *White dupin* growth. *Chemosphere*, 60: 365-371.
- Cavalcanti do Espírito Santo, M., Almeida Burity, H., Barbosa da Silva, F.S., Pereira, S.V. y Costa Maia, L. 2010. Glomalin production and microbial activity in soils impacted by gypsum mining in a brazilian semiarid area. *Am. J. Agricultural Biol. Sci.*, 5: 422-429.
- Caveness, F.E. y Jensen, H.J. 1955. Modification of centrifugal flotation technique for the isolation and concentration of nematodes and their eggs form soil and plant tissue. *P. Helm. Soc. Wash.*, 22: 87-89.
- Chan, G.Y.S., Ye, Z.H. y Wong, M.G. 2003. Comparison of four *Sesbania* species to remediate Pb/Zn and Cu mine tailings. *Environ. Manag.*, 32: 246-251.
- Chaney, R.L., Malik, M., Li, Y.M., Brown, S.L., Brewer, E.P., Angle, J.S. y Baker, A.J.M. 1997. Phytoremediation of soil metals. *Current Opinions in Biotechnology*, 8: 279-284.

- Chapin, F.S., Schuelse, E.D. y Mooney, H.A. 1992. Biodiversity and ecosystem processes. *Trends Ecol. Evol.*, 7: 107-108.
- Chaves, E., Echeverria, M. y Torres, M. 1995. Clave para determinar géneros de nemátodos del suelo de la República Argentina. INTA- Estación Experimental Agropecuaria Balcarce- Facultad de Ciencias Agrarias- Universidad Nacional de Mar del Plata. 91 pp.
- Chen, S., Xu, M., Ma, Y. y Yang, J. 2007. Evaluation of different phosphate amendments on availability of metals in contaminated soil. *Ecotox. Environ. Safe.*, 67: 278-285.
- Chen, G., Qin, J., Shi, D., Zhang, Y. y Ji, W. 2009. Diversity of soil nematodes in areas polluted with heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Lanzhou, China. *Environ. Manage.*, 44: 163-72.
- Chen, X., Wright, J., Conca, J. y Peurrung, L. 1997a. Effects of pH on heavy metal sorption on mineral apatite. *Environ. Sci. Technol.*, 31: 624-631.
- Chen, X., Wright, J., Conca, J. y Perurrung, L. 1997b. Evaluation of heavy metal remediation using mineral apatite. *Water Air Soil Pollut.*, 98: 57-78.
- Clark, C., Tucker, A. y Turton, J. 1971. Sampling technique for estimating roundworm burdens of sheep and cattle. *Exp. Parasitology*, 30: 181-186.
- Clemens, S., Schroeder, J.I. y Degenkolb, T. 2001. *Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatase synthase. *European J. Biochem.*, 268: 3640-3643.
- Clemente, R., Almela, C. y Bernal, M.P. 2006. A remediation strategy based on active phytoremediation followed by natural attenuation in a soil contaminated by pyrite waste. *Environ. Pollut.*, 143: 397-406.
- Cobbett, C. y Goldsbrough, P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 53: 159-182.
- Coleman, D.C., Blair, J.M., Elliot, E.T. y Wall, D.H. 1999. Soil invertebrates. Pp. 349-377 en Robertson, GP; DC Coleman; CS Bedsoe & P Sollins (Eds.) *Standard Soil Methods for Long-term Ecological Research*. Oxford University Press, NY.
- Cooksey, A. y Barnett, W.B. 1979. Sequential multielement atomic absorption analysis of agricultural samples. *Atomic Abs. Newsletter*, 18: 1-4.
- Cornejo, P., Meier, S., Borie, G., Rillig, M.C. y Borie, F. 2008. Glomalin-related soil protein in a Mediterranean ecosystem affected by a copper smelter and its contribution to Cu and Zn sequestration. *Sci Total Environ.*, 406: 154-160.
- Cornejo, P., Pérez-Tienda, J., Meier, S., Valderas, A., Borie, F., et al. 2013. Copper compartmentalization in spores as a survival strategy of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. *Soil Biol, Biochem.*, 57: 925-928.
- Cotter-Howells, J. 1996. Lead phosphate formation in soils. *Environ. Pollut.*, 93: 9-16.
- Cunningham, S.D., Berti, W.R. y Huang, J.W. 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends Biotech.*, 13: 393-397.
- Cusato, M.S., Tortosa, R.D., Valiente, L., Barneix, A.J., y Puelles, M.M. 2007. Effects of Zn<sup>2+</sup> on nodulation and growth of a South American actinorhizal plant, *Discaria Americana* (Rhamnaceae). *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 23: 771-777.

- Dai, J., Becquer, T., Rouiller, J.H., Reversat, G., Bernhard-Reversat, F. y Lavelle, P. 2004. Influence of heavy metals on C and N mineralisation and microbial biomass in Zn-, Pb-, Cu-, and Cd-contaminated soils. *Applied Soil Ecol.*, 25: 99-109.
- Datta, J.K., Bandhyopadhyay, A., Banerjee, A. y Mondal, N.K. 2011. Phytotoxic effect of chromium on the germination, seedling growth of some wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars under laboratory condition. *J. Agricultural Technol.*, 7: 395-402.
- De Deyn, G.B., Raaijmakers, C.E., Zoomer, H.R., Berg, M.P., de Ruiter, P.C., et al. 2003. Soil invertebrate fauna enhances grassland succession and diversity. *Nature*, 422: 711-713.
- Defrieri, R.L., Catán, S., Quinteros, M.C., Sarti, G. y Effron, D. 2012. Glomalina en un suelo de un ecosistema forestal andino patagónico. XIX Congreso Argentino de Química, Mar del Plata, Argentina.
- De Ruiter, P.C., Nuetel, A.M. y Moore, J. 2005. The balance between productivity and food web structure in soil ecosystems. Pp. 50 en Bardgett RD, MB Usher y DW Hopkins (Ed) *Biological Diversity and Function in Soils*. Cambridge University Press.
- Dias, L.E., Melo, R.F., Vargas de Mello, J.W., Oliveira, J.A. y Lee Daniels, W. 2010. Growth of seedlings of Pigeon Pea (*Cajanus cajan* (L.) MILLSP), wand riverhemp (*Sesbania virgata* (CAV.) PERS.), and lead tree (*Leucaena leucocephala* (LAM). DE WIT) in an arsenic-contaminated soil. *R. Bras. Ci. Solo*, 34: 975-983.
- Díez, J., Kidd, P. y Monterroso, C. 2002. Biodisponibilidad de metales en suelos y acumulación en plantas en el área de Tras-os-Montes (NE Portugal): influencia del material original. *Edafología*, 9: 313-328.
- Di Salvatore, M., Carafa, A.M. y Carratù, G.A. 2008. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: a comparison of two growth substrates. *Chemosphere*, 73: 1461-1464.
- Di Salvatore, M., Carafa, A.M., Mingo, A. y Carratù, G.A. 2012. Evaluation of heavy metal toxicity on Radish: comparison between soil and floating hydroponics systems. *Am. J. Exp. Agr.*, 2: 174-185.
- Dragović, S., Mihailović, N. y Gajić, B. 2008. Heavy metals in soils: distribution, relationship with soil characteristics and radionucleitides and multivariate assessment of contamination sources. *Chemosphere*, 72: 491-495.
- Driver, J.D., Holben, W.E. y Rilling, M.C. 2005. Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.*, 37: 101-106.
- Duarte, D.M., Gomes, M.P., Barreto, L.C., Matheus, M.T. y Garcia, Q.S. 2012. Toxic trace elements effects on seed germination of four Brazilian Savanna tree species. *Seed Sci. Technol.*, 40: 425-432.
- Ekschmitt, K., y Korthals, G.W. 2006. Nematodes as sentinels of heavy metals and organic toxicants in the soil. *J. Nematol.*, 38: 13-19.

- Elsgaard, L., Petersen, S.O. y Deboz, K. 2001. Effects and risk assessment of linear alkylbenzene sulfonates in agricultural soil: 1. Short-term effects on soil microbiology. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20: 1656–1663.
- Espinosa, L.F., Parra, J.P. y Villamil, C. 2011. Determinación del contenido de metales pesados en las fracciones geoquímicas del sedimento superficial asociado a los manglares de la ciénaga grande de Santa Marta, Colombia. *Bol. Invest. Mar. Cost.*, 40: 7-23.
- Etchichury, M.C. y Tófaló, O.R. 2004. Mineralogía de arenas y limos en suelos, sedimentos fluviales y eólicos actuales del sector sur de la cuenca Chacoparanense. Regionalización y áreas de aporte. *Revista de la Asociación Geológica Argentina*, 59: 317-329.
- Eweis, J.B., Ergas, S.J., Chang, D.P.V. y Schroeder, E.D. 1999. Principios de biorrecuperación. 1º Ed. Mc Graw Hill (Ed.) Madrid.
- Fageria, N; Baligar, V. y Clark, R. 2002. Micronutrients in crop production. *Advances in Agronomy*, 77: 185-268.
- Faithfull, N.T. 2004. *Methods in Agricultural Chemicals Analysis: A Practical Handbook*. Wallingford, Oxon, CAB International Publishing. 266 pp.
- Ferris, H., Bongers, T., de Goede R.G.M. 2001. A framework for soil food web diagnostics: extension of the nematode faunal analysis concept. *App. Soil Ecol.*, 18: 13-29.
- Ferro Orozco, A.M., E.M. Contreras y N.E. Zaritsky. 2012. Reducción de cromo hexavalente mediante tratamiento biológico utilizando un residuo de la industria láctea. Pp. 27-50 en: RIARTAS (Ed.) Residuos urbanos e industriales. Fuente de problemas u oportunidades? Argentina.
- Flogeac, K., Guillon, E. y Aplin-court, M. 2007. Competitive sorption of metal ions onto a north-eastern France soil. Isotherms and XAFS studies. *Geoderma*, 139: 180-189.
- Fontes, M.P.F. y Gomes, P.C. 2003. Simultaneous competitive adsorption of heavy metals by the mineral matrix of tropical soils. *Applied Geochem.*, 18: 795-804.
- Freckman, D.W. y Baldwin, J.G. 1990. Nematoda. Pp 155-200 en Dindal D.L. (Ed.) *Soil Biology Guide*. New York.
- Freckman, D.W. y Ettema, CH. 1993. Assessing nematode communities in agroecosystems of varying human intervention. *Agr. Ecosyst. Environ.*, 45: 239-261.
- Fuentes, A., Llorens, M., Sáez, J., Aguilar, M.I., Ortuño, J.F. y Mesenguer, V.F. 2004. Phytotoxicity and heavy metals speciation of stabilised sewage sludge. *J. Hazard. Mater.*, 108: 161-169.
- Garrido, F., Illera, V., Campbell, C. y García-González, M. 2006. Regulating the mobility of Cd, Cu and Pb in an acid soil with amendments of phosphogypsum, sugar foam and phosphoric rock. *Eur. J. Soil Sci.*, 57: 95-105.
- Garbisu, C. y Alkorta, I. 2001. Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technol.*, 77: 229-236.

- Garbisu, C., Becerril, J.M., Epelde, L. y Alkorta, I. 2007. Bioindicadores de la calidad del suelo: herramienta metodologica para la evaluación de la eficacia de un proceso fitorremediador. *Ecosistemas*, 16: 44-49.
- García Huidibro, J., Monteith, J.L. y Squire, G.R. 1982. Time, Temperature, and germination of pearl millet (*pennisetum typhoides* S.& H). *J. Experim. Botany*, 33: 288-296.
- Geebelen, W., Adriano, D.C., Van Der Lelie, D., et al. 2003. Selected bioavailability assays to test the efficacy of amendment-induced immobilization of lead in soils. *Plant Soil*, 249: 217-228.
- Georgieva, S.S., McGrath, S.P., Hooper, D.J. y Chambers, B.S. 2002. Nematode communities under stress: the long-term effects of heavy metals in soil treated with sewage sludge. *Appl. Soil Ecol.*, 20: 27-42.
- Ghosh, M. y Singh, S.P. 2005. A review on Phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts. *Applied Ecology Environ. Res.*, 3: 1-18.
- Gibert, O., De Pablo, J., Cortina, J.L. y Ayora, C. 2003. Evaluation of municipal compost/limestone/iron mixtures as filling material for permeable reactive barriers for in-situ acid mine drainage treatment. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 78: 489-496.
- Giller, K.E., Witter, E. y McGrath, S.P. 1998. Toxicity of heavy metals to micro-organisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol. Biochem.*, 30: 1389-1414.
- Gilsanz, J.C. 2007. Hidroponia. En *Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología* (Ed.), INIA, Uruguay. 31 pp.
- Gil-Stores, F., Trasar-Cepeda, C., Leiros, M.C. y Seoane, S. 2005. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biol. Biochem.*, 37: 877-887.
- Giuffré, L., Ratto, S., Marban, L., Shonwald, J. y Romaniuk, R. 2005. Riesgo por metales pesados en horticultura urbana. *Ci. Suelo*, 23: 101-106.
- Gleyzes, C., Tellier, S. y Astruc, M. 2001. Chemical characterization of lead in industrially- contaminated soils. Pp. 57 en *Proc. 6th international Conference Biogeochemistry Trace Elements*, Guelph.
- Gleyzes, C, Tellier, S., Sabrier, R. y Astruc, M. 2001. Arsenic characterization in industrial soils by chemical extractions. *Environ. Technol.*, 22: 27-38.
- Godinez-Álvarez, H. 1999. Germinación de semillas de 32 especies de plantas de la costa de Guerrero: su utilidad para la restauración ecológica. *Polibotánica*, 11: 1-19.
- Golan-Goldhirsh, A., Barazani, O., Nepovim, A., Soudek, P., Smercek, S., et al. 2004. Plant response to heavy metals and organic pollutants in cell culture and at whole plant level. *Review articles. J. Soils Sediment*, 4: 133-140.
- Gomes, P.C., Fontes M.P., Da Silva, A.G., Mendoca, D.E.S. y Netto, E. 2001. Selectivity sequence and competitive adsorption of heavy metals by Brazilian soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 65: 1115-1121.

- Gondek, K. 2006. Contents of various forms of cadmium, copper, lead and chromium in soil after application of untreated and composted tannery sewage sludge. *Plant Soil Environ.*, 52: 199-210.
- Gonzalez-Chavez, M.C., Carrillo-Gonzalez, R., Wright, S.F. y Nichols, K. 2004. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environ. Pollut.*, 130: 317-323.
- Gruiz, K. 2005. Soil testing triad and interactive ecotoxicity tests for contaminated soil. Pp. 45-70 en Fava F, Canepa P, (Eds.) *Soil Remediation Series*. Venecia, Italia.
- Gupta, U.C. y Gupta, S.C. 1998. Trace element toxicity relationships to crop production and livestock and human health: Implications for management. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 29: 11-14.
- Gupta, A.K. y Sinha, S. 2006. Chemical fractionation and heavy metal accumulation in the plant of *Sesamum indicum* (L.) var. T55 grown on soil amended with tannery sludge: Selection of single extractants. *Chemosphere*, 64: 161-173.
- Gupta A.M., Su, S.W. y Chen, Z.S. 2011. Heavy-metal bioavailability and chelate mobilization efficiency in an assisted phytoextraction process by *Sesbania sesban* (L.) Merr. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 42: 231-245.
- GWRTAC. 1997. Remediation of metals-contaminated soils and groundwater. Tech. Rep. TE-97-01, GWRTAC. Pittsburgh, USA.
- Hall, J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.*, 53: 1-11.
- Hawley, E.L., Deeb, R.A., Kavanaugh, M.C. y Jacobs, R.G. 2004. Treatment technologies for chromium(VI). Pp. 273-308 en J. Guertin, C. P. Avakian, y J.A. Jacobs (Eds.) *Chromium(VI) Handbook*. CRC Press, USA.
- Hayes, M.H.B. y Clapp, C.E. 2001. Humic substances: considerations of compositions, aspects of structure, and environmental influences. *Soil Sci.*, 166: 723-737.
- Herrera, A.L. 2000. Manejo de la solución nutritiva en la producción de tomate en hidroponia. *Terra Latinoamericana*, 17: 221-229.
- Hettiarachchi, G.M., Pierzynski, G.M. y Ransom, M.D. 2001. In situ stabilization of soil lead using phosphorus. *J. Environ. Qual.*, 30: 1214-1221.
- Heyns, J. 1971. A guide to the plant and soil nematodes of South Africa. Capetown: A. A. Balkema. 233 pp.
- Hinajosa, B.M., Carreira, J.A., García-Ruiz, R. y Dick, P.R. 2004. Soil moisture pre-treatment effects on enzyme activities as indicators of heavy metal-contaminated and reclaimed soils, *Soil Biol. Biochem.*, 36: 1559-1568.
- Hobbs, R.J. y Harris, J.A. 2001. Restoration ecology: repairing the Earth's ecosystems in the new millennium. *Restoration Ecology*, 9: 239-246.
- Houba, V.J.G., Novozamsky, L., Lexmond, T.M. y Van der Lee, J.J. 1990. Applicability of 0.01 M CaCl<sub>2</sub> as a single extractant for the assessment of the nutrient status of soils and other diagnostic purposes. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 21: 2281-2290.
- Hutchinson, S.L., Bankds, M.K. y Schwab, A.P. 2001. Phytoremediation of aged petroleum sludge: effect of inorganic fertilizer. *J. Environ. Qual.*, 30: 395-403.

- Israr, M., Jewell, A., Kumarb, D. y Sahi, S.V. 2011. Interactive effects of lead, copper, nickel and zinc on growth, metal uptake and antioxidative metabolism of *Sesbania drummondii*. J. Hazard. Mater., 186: 1520-1526.
- Ince, N.H., Dirilgen, N., Apikyan, I.G., Tezcanli, G. y Ustun, B. 1999. Assessment of toxic interactions of heavy metals in binary mixtures: A statistical approach. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 36: 365-372.
- Izaguirre, M.L. 2005. Distribución geográfica, nodulación y comportamiento agronómico de tres especies de *Sesbania* nativas de zonas inundables en Venezuela. Agronomía Trop., 55: 63-81.
- Jadia, C.D. y Fulekar, M.H. 2008. Phytotoxicity and remediation of heavy metals by fibrous root grass (*sorghum*). J. Appl. Biosci., 10: 491-499.
- Jadia, C.D. y Fulekar, M.H. 2009. Phytoremediation of heavy metals: Recent techniques. African J. Biotechnol., 8: 921-928.
- James, B.R., Petura, J.C., Vitale, R.J. y Mussoline, G.R. 1997. Oxidation-reduction chemistry of chromium: Relevance to the regulation and remediation of chromate-contaminated soils. Soil Contam., 6: 569-580.
- Jensen, J. y Sverdrup, L.E. 2002. Joint toxicity of linear alkylbenzene sulfonates and Pyrene on *Folsomia fimetaria*. Ecotox. Environ. Safe., 52: 75-81.
- Johnson, C.M., Stout, P.R., Broyer, T.C. y Carlton, A.B. 1957. Comparative chlorine requirement of different plant species. Plant Soil, 8: 337-353.
- Juvonen, R., Martikainen, E., Schultz, E., Joutti, A., Ahtiainen, J. y Lehtokari, M. 2000. A battery of toxicity tests as indicators of decontamination in composting oily waste. Ecotox. Environ. Safe., 47: 156-166.
- Kabata-Pendias, A. 2004. Soil-plant transfer of trace elements an environmental issue. Geoderma, 122: 143-149.
- Kayser, A., Wenger, K., Keller, A., Attinger, W., Felix, W., Gupta, S.K. y Schulin, R. 2000. Enhancement of phytoextraction of Zn, Cd and Cu from calcareous soil: The use of NTA and sulfur amendments. Environ. Sci. Technol., 34: 1778-1783.
- Khan, S., Cao, Q., Zheng, Y.M., Huang, Y.Z. y Zhu, Y.G. 2008. Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. Environ. Pollut., 152: 686-692.
- Klauber-Filho, O. 1999. Ecologia e atividade de fungos micorrízicos arbusculares em solo poluído com metais pesados. Tesis de Doctorado, Universidade Federal de Lavras, Brasil. 161 pp.
- Kidd P.S., Becerra Castro, C., García Lestón, M. y Monterroso, C. 2007. Aplicación de plantas hiperacumuladoras de níquel en la fitoextracción natural: El género *Alyssum L.* Ecosistemas, 16: 26-43.
- Kirpichtchikova, T.A., Manceau, A., Spadini, L., Panfili, F., Marcus, M.A. y Jacquet, T. 2006. Speciation and solubility of heavy metals in contaminated soil using X-ray microfluorescence, EXAFS spectroscopy, chemical extraction, and thermodynamic modeling. Geochim. Cosmochim. Acta, 70: 2163-2190.
- Knox, A.S., Seaman, J.C., Mench, M.J. y Vangronsveld, J. 2000. Remediation of metal- and radionuclides-contaminated soils by in situ stabilization techniques. Pp. 21-60



- en Iskandar IK (Ed.) Environmental restoration of metals-contaminated soils. Boca Ratón, CL.
- Kookana, R. y Naidu, R. 2001. Cadmium desorption from a Xeralf and an Oxisol: Effect of ionic strength of solution. Pp. 53 en Proceedings of the Sixth International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements, Guelph, Canada.
- Kordel, W., Dassenakis, M., Lintelmann, J. y Padberg, S. 1997. The importance of natural organic material for environmental processes in waters and soils (Technical Report). Pure App. Chem., 69: 1571-1600.
- Kraak, M.H.S., Lavy, D., Schoon, H., Toussaint, M., Peeters, W.H.M. y van Straalen, N.M. 1994. Ecotoxicity of mix-tures of metals to the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. Environ. Toxicol. Chem., 13: 109-114.
- Kumar Sharma, R., Agrawal, M. y Marshall, F. 2007. Heavy metal contamination of soil and vegetables in suburban areas of Varanasi, India. Ecotox. Environ. Safe., 66: 258-266.
- Kumpiene, J. 2003. Role of soil organic matter in the immobilisation of metals. Licentiate Thesis. Div. of Waste Science & Technology, Lulea University of Technology (LTU). 21 pp.
- Kumpiene, J., Lagerkvist, A. y Maurice, C. 2007. Stabilization of Pb- and Cu-contaminated soil using coal fly ash and peat. Environ. Pollut., 145: 365-373.
- Kumpiene, J., Lagerkvist, A. y Maurice, C. 2008. Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments – a review. Waste Manage., 28: 215–225.
- Lafuente, A.L., González, C., Quintana, J.R., Vázquez, A. y Romero, A. 2008. Mobility of heavy metals in poorly developed carbonate soils in the Mediterranean region. Geoderma, 145: 238-244.
- Lagomarsino, A., Mench, M., Marabottini, R., Pignataro, A., Grego, S., Renella, G. y Staz, SR. 2011. Copper distribution and hydrolase activities in a contaminated soil amended with dolomitic limestone and compost. Ecotox. Environ. Safe., 74: 2013-2019.
- Laos, F., Mazzarino, M.J., Walter, I., Roselli, L., Satti, P. y Moyano, S. 2002. Composting of fish offal and biosolids in northwestern Patagonia. Bioresource Technol., 81: 179-186.
- Laos, F. 2003. Compostaje de residuos orgánicos de actividades productivas y urbanas en la región Andino-Patagónica: determinación de índices de madurez para su utilización agronómica. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional del Comahue, Argentina. 148 pp.
- Laperche, V. y Traina, S.J. 1998. Inmobilization of Pb by hidroxiapatite. Pp. 225-276 en J.A. Everett (Ed.) Adsorption of Metals by Geomedia: Variables, Mechanisms, and Model Applications. Academic Press, Orlando, FL, USA.
- Lasat, M.M. 2002. Phytoextraction of Toxic Metals: A Review of Biological Mechanisms. J. Environ. Qual., 31: 109-120.
- Lavado, R.S., Roriguez, M.B., Scheiner, J.D., Taboada, M.A., Rubio, G., et al. 1998. Heavy metals in soils of Argentina: Comparison between urban and agricultural soils. Commun. Soil Sci. Plant Anal., 29: 11-14.

- Larney, F.J., Sullivan, D.M., Buckley, K.E. y Eghball, B. 2006. The role of composting in recycling manure nutrients. *Canadian J. Soil Sci.*, 86: 597-611.
- Leake J., Johnson, D., Donnelly, D., Muckle, G., Boddy, L. y Read, D. 2004. Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Can. J. Bot.*, 82: 1016-1045.
- Lee, S.M., Moon, J.S., Domier, L.L. y Korban, S.S. 2002. Molecular characterization of phytochelatin synthase expression in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.*, 40: 727-733.
- Leitgib, L., Kálmán, J. y Gruiz, K. 2007. Comparison of bioassays by testing whole soil and their water extract from contaminated sites. *Chemosphere*, 66: 428-434.
- Lefevre, I., Marchal, G., Correal, E., Zanuzzi, A. y Lutts, S. 2009. Variation in response to heavy metals during vegetative growth in *Dorycnium pentaphyllum*. *Scop. Plant Growth Regulation*, 59: 1-11.
- Leyval, C. y Weissenhorn, H. 1996. Tolerance to metals of arbuscular mycorrhizal fungi from heavy metal polluted soils: A summary of results. Pp. 452-454 en Azcón-Aguilar C. y Barea, J. M. (Eds.) *Mycorrhizae in integrated systems: from genes to plant development*. European Commission, Brussels. Belgium
- Linden, D.R., Hendrix, P.F., Coleman, D.C. y Van Vliet, P.C.J. 1994. Faunal indicators of soil quality. *Soil Sci.*, 35: 91-106.
- Ling, W., Shen, Q., Gao, Y., Gu, X. y Yang, Z. 2007. Use of bentonite to control the release of copper from contaminated soils. *Aus. J. Soil Res.*, 45: 618-623.
- Linden, D.R., Hendrix, P.F., Coleman, D.C. y Petra van Vliet, C.J. 1994. Faunal indicators of soil quality. Pp. 91-106 en J.W. Doran et al. (ed) *Defining soil quality for a sustainable environment*. SSSA Spec. Publ. 35. SSSa, Madison, WI, USA.
- Llosa, R., Noriega, E., Negro de Aguirre, E. y Kesten, E. 1990. Niveles de plomo, cadmio, zinc y cobre en suelos del área metropolitana y suburbana de Buenos Aires. *Ci. Suelo*, 8: 3-8.
- Lovelock C.E., Wright, S.F. y Nichols, K.A. 2004. Using glomalin as an indicator for arbuscular mycorrhizal hyphal growth: An example from a tropical rain forest soil. *Soil Biol. Biochem.*, 36: 1009-1012.
- Lovelock, C., y Miller, R. 2002. Heterogeneity in inoculum potencial and effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology*, 83: 823-832.
- Luo, Y., y Rimmer, D.L. 1995. Zinc-Copper interaction affecting plant growth on metal-contaminated soil. *Environ. Pollut.*, 88: 79-83.
- Macnair, M.R., 1993. Tansley Review No. 49. The genetics of metal tolerance in vascular plants. *New Phytol.*, 124: 541-559.
- Madrid, L. 1999. Metal retention and mobility as influenced by some organic residues added to soils: A case study. Pp. 201-223 en Iskandar IK (Eds.) *Fate and Transport of Heavy Metals in the Vadose Zone*, Selim. Boca Raton, FL, USA.
- Madrid, L., Diaz-Barrientos, E., Ruiz-Cortés, E., Reinoso, R., Biasioli, M., et al. 2006. Variability in concentrations of potentially toxic elements in urban parks from six European cities. *J. Environ. Monitor.*, 8: 1158-1165.

- Madejón, E., Pérez de Mora, A., Felipe, E., Burgos, P. y Cabrera, F. 2006. Soil amendments reduce trace element solubility in a contaminated soil and allow re-growth of natural vegetation. *Environ. Pollut.*, 139: 40-52.
- Maenpaa, K.A., Kukkonen, J.V.K. y Lydy, M.J. 2002. Remediation of heavy metal contaminated soils using phosphorus: Evaluation of bioavailability using an earthworm bioassay. *Archives Environ. Contamination Toxicol.*, 43: 389-398.
- Maguire, J.D. 1962. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci.*, 2: 176-177.
- Maila, M. y T. Cloete. 2002. Germination of *Lepidium sativum* as a method to evaluate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal from contaminated soil. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 50: 107-113.
- Maliszweska-Kordybach, B. y Smreczak, B. 2003. Habitat function if agricultural soils as affected by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. *Environ. Int.*, 28: 719-728.
- Marchiol, L., Assolari, S., Sacco, P. y Zerbi, G. 2004. Phytoextraction of heavy metals by canola (*Brassica napus*) and radish (*Raphanus sativus*) grown on multicontaminated soil. *Environ. Pollut.*, 132: 21-27.
- Martínez, C.E. y Motto, H.L. 2000. Solubility of lead, zinc and cooper added to mineral soils. *Environ. Pollut.*, 107: 153-158.
- Martínez Sánchez, M.J., Pérez Sirvent, C., Tudela, M.L., Molina Ruiz, J., Linares Moreno, P., Navarro Hervás, C., et al. 2005. Desertificación: Monitorización mediante indicadores de degradación química. Programa de iniciativa comunitaria INTERREG IIIB ESPACIO MEDOCC. Proyecto Desernet. Acción piloto Región de Murcia. Ed. Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente.
- Mazzarino, M.J. y Laos, F. 2000. Composting biosolids in Patagonia. *BioCycle*, 41: 83-85.
- Mazzarino, M.J., Satti, P. y Roselli, L. 2012. Indicadores de estabilidad, madurez y calidad de compost. Pp. 349 en Mazzarino M. y P. Satti (Eds.) *Compostaje en la Argentina: Experiencias de producción, calidad y uso*. Buenos Aires, Argentina.
- McBride, M., Richards, B., Steenhuis, T., Russo, J. y Sauvé, S. 1997. Movility and solubility of toxic metals and nutrients in soil fifteen years after sludge application. *Soil Sci.*, 162: 487-500.
- McGrath, S.P. y Cunliffe, C.H. 1985. A simplified method for the extraction of the metals Fe, Zn, Cu, Ni, Pb, Cr, Co and Mn from soils and sewage sludges. *J. Sci. Food Agric.*, 36: 794-798.
- McGrath, S.P., y Cegarra, J. 1992. Chemical extractability of heavy metals during and after long-term applications of sewage sludge to soil. *J. Soil Sci.*, 43: 313-321.
- McGowen, S.L., Basta, N.T., Brown, G.O. 2001. Use of diammonium phosphate to reduce heavy metal solubility and transport in smelter contaminated soil. *J. Environ. Qual.*, 30: 493-500.
- McSorley, R. 2003. Adaptations of nematodes to environmental extremes. *Florida Entomologist*, 86: 138-142.

- Mench, M., Bussiere, S., Boisson, J., Castaing, E. Vangronsveld, J., et al. 2003. Progress in remediation and revegetation of the barren Jales gold mine spoil after in situ treatments. *Plant Soil*, 249: 187-202.
- Mench, M., Vangronsveld, J., Beckx, C. y Ruttens, A. 2006. Progress in assisted natural remediation of an arsenic contaminated agricultural soil. *Environ. Pollut.*, 144: 54-61.
- Menéndez, A.M., Montemerlo, H., Weisstaub, A.R., Alloatti, S., Rusi, F., et al. 2005. Niveles plasmáticos y eritrocitarios de zinc y cobre en pacientes críticos con nutrición parenteral y su relación con el contenido de las fórmulas: Estudio preliminar. *Nutr. Hosp.*, 20: 189-196.
- Mills, T., Arnold, B., Sivakumaran, S., Northcott, G., Vogeler, I., Robinson, B., Norling, C. y Leonil, D. 2006. Phytoremediation and long term site management of soil contaminated with pentachlorophenol (PCP) and heavy metals. *J. Environ. Manage.*, 79: 232-241.
- Mitton, F.M., Gonzalez, M., Peña, A. y Miglioranza, K.S.B. 2012. Effects of amendments on soil availability and phytoremediation potential of aged p,p'-DDT, p,p'-DDE and p,p'-DDD residues by willow plants (*Salix sp.*). *J. Hazard. Mater.*, 203: 62-68.
- Mondino, E.A. 2001. Efecto de las rotaciones, las labranzas y la fertilización nitrogenada sobre la nematofauna del suelo. Tesis de Magister en Producción Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina. 66 pp.
- Nagendran, R., Selvam, A., Joseph, K., Chiemchaisri, C. 2006. Phytoremediation and rehabilitation of municipal solid waste landfills and dumpsites: A brief review. *Waste Manage.*, 26: 1357-1369.
- Naik, N.N., Tare, H.L., Sherikar, A.K., Deore, S.R. y Dama, G.Y. 2011. Central nervous system stimulant effect of extracts obtained from the barks of *Sesbania sesban*. *Int. J. Inst. Pharm. Life Sci.*, 1: 77-92.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G. y Renella, G. 2003. Microbial diversity and soil functions. *European J. Soil Sci.*, 54: 655-670.
- Navas, A., Flores-Romero, P., Sánchez-Moreno, S., Camargo, J.A. y McGawley, E.C. 2010. Effects of heavy metal soil pollution on nematode communities after the Aznalcollar mining spill. *Nematropica*, 40: 13-29.
- Navarro-Aviñó, J.P., Aguilar Alonso, I. y López-Moya, J.R. 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*, 16: 10-25.
- Neher, D.A. 2001. Role of nematodes in soil health and their use as indicators. *J. Nematol.*, 33: 161-168.
- Newsham K., Fitter, A. y Watterson, A. 1995. Arbuscular mycorrhiza protect an annual grass from root pathogenic fungi in the field. *J. Ecol.*, 3: 991-1000.
- Nichols, K. 2003. Characterization of glomalin, a glycoprotein produced by arbuscular mycorrhizal fungi. Tesis de Doctorado en Natural Resource Sciences. College Park, Universidad de Maryland, USA. 285 pp.

- Nissen, L.R. y Lepp, N.W. 1997. Baseline concentrations of copper and zinc in shoot tissues of a range of salix species. *Biom. Bioen.*, 12: 115-120.
- Nogales, B. 2005. La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: Descubriendo la punta del iceberg. *Ecología: Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente*, vol 2.
- Nortcliff, S. 2002. Standardisation of soil quality attributes. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 88: 161-68.
- O'Dell, R., Silk, W., Green, P. y Claassen, V. 2007. Compost amendment of Cu–Zn mine- spoil reduces toxic bioavailable heavy metal concentrations and promotes establishment and biomass production of *Bromus carinatus* (Hook and Arn.). *Environ. Pollut.*, 148: 115–124.
- Odum, E.P., Finn, J.T. y Franz, E.H. 1979. Perturbation theory and the subsidy-stress gradient. *Biosci.*, 29: 349-352.
- Odum, E.P. y Biever, L.J. 1984. Resource quality, mutualism, and energy partitioning in food chains. *Am. Nat.*, 124: 360-376.
- Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable (OEIDRUS). 2009. Estudio bibliográfico sobre la salinidad del Valle de Mexicali. Gobierno de Estado, Mejico. 27 pp.
- Oncel, I., Keles, Y. y Ustun, A.S. 2000. Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings. *Environ. Pollut.*, 107: 315-320.
- Orroño, D.I. y Lavado, R.S. 2009. Distribution of extractable heavy metals in different soil fractions. *Chem. Spec. Bioavailab.*, 21: 193-198.
- Orroño, D.I. y Lavado, R.S. 2010. Heavy metal accumulation in geranium (*Pelargonium hortorum*) and effects on growth and quality of plants. *Agrochimica*, 2: 116-128.
- Orroño, D.I. 2011. Acumulación de metales (cadmio, zinc, cobre, cromo, níquel y plomo) en especies del género *Pelargonium*: suministro desde el suelo, ubicación en la planta y toxicidad. Tesis de Doctorado de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. 105 pp.
- Orroño, D.I., Schindler, V. y Lavado, R.S. 2012. Heavy metal availability in *Pelargonium hortorum* rhizosphere: interactions, uptake and plant accumulation. *J. Plant Nutr.*, 35: 1374-1386.
- Otitoloju, A.A. 2003. Relevance of joint action toxicity evaluations in setting realistic environmental safe limits of heavy metals. *J. Environ. Manag.*, 67: 121–128.
- Panfili, F., Manceau, A., Sarret, G., Spadini, L., Kirpichtchikova, T., Bert, V., et al. 2005. The effect of phytostabilization on Zn speciation in a dredged contaminated sediment using scanning electron microscopy, X-ray fluorescence, EXAFS spectroscopy, and principal components analysis. *Geochim Cosmochim. Acta*, 69: 2265–84.
- Paquin, P.R., Gorsuch, J.W., Apte, S., Batley, G.E., Bowles, K.C., et al. 2002. The biotic ligand model: a historical overview. *Comp. Biochem. Physiol.*, 133: 3-35.

- Paradelo, R., Villada, A. y Barral, M.T. 2011. Reduction of the short-term availability of copper, lead and zinc in a contaminated soil amended with municipal solid waste compost. *J. Hazard. Mater.*, 18: 98-104.
- Parat, C., Chaussod, R., Leveque, J., Dousset, S. y Andreux, F. 2002. The relationship between copper accumulated in vineyard calcareous soils and soil organic matter and iron. *European J. Soil Sci.*, 53: 663-669.
- Pardo, T., Clemente, R. y Bernal, M.P. 2011. Effects of compost, pig slurry and lime on trace element solubility and toxicity in two soils differently affected by mining activities. *Chemosphere*, 84: 642-650.
- Pardo, T., Clemente, R., Epelde, L., Garbisu, C. y Bernal, M.P. 2014. Evaluation of the phytostabilisation efficiency in a trace elements contaminated soil using soil health indicators. *J. Hazard. Mater.*, 268: 68-76.
- Park, B.Y., Lee, J.K., Ro, H.M. y Kim, Y.H. 2011. Effects of heavy metal contamination from an abandoned mine on nematode community structure as an indicator of soil ecosystem health. *Appl. Soil Ecol.*, 51: 17-24.
- Parkpain, P., Sreesai, S. y Delaune, R. 2000. Bioavailability of heavy metals in sewage sludge-amended Thai soils. *Water Air Soil Pollut.*, 122: 163-182.
- Pascual, J.A., Hernández, T., García, C. y Ayuso, M. 1998. Carbon mineralization in an arid soil amended with organic wastes of varying degrees of stability. *Commun. Soil Sci. Plant. Anal.*, 29: 835-846.
- Paszkowski, U. 2006. A journey through signalling in arbuscular mycorrhizal symbioses 2006. *New Phytol.*, 172: 35-46.
- Patterson J.W. 1985. *Industrial Wastewater Treatment Technology*. Butterworth publishers. Stoneham, Londres, UK. 467 pp.
- Pawlowska, T. y Charvat, I. 2004. Heavy-metal stress and developmental patterns of arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 6643-6649.
- Pérez, G., Sirio, A.A., Sotelo, C.E. y Driutti, A.A. 2012. Determinación de proteína reactiva (glomalina) por el método de Bradford en suelos de lotes citrícolas y un campo natural. XVII Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad Nacional del Nordeste, Argentina.
- Pérez de Mora, A., Ortega-Calvo, J.J., Cabrera, F. y Madejón, E. 2005. Changes in enzyme activities and microbial biomass after “*in situ*” remediation of a heavy metal-contaminated soil. *Applied Soil Ecol.*, 28: 125-137.
- Pérez de Mora, A., Burgos, P., Madejón, E., Cabrera, F., Jaekel, P. y Schlöter, M. 2006. Microbial community structure and function in a soil contaminated by heavy metals: effects of plant growth and different amendments. *Soil Biol. Biochem.*, 38: 327-341.
- Perucci, P. 1990. Effect of the Addition of municipal solid-waste compost on microbial biomass and enzyme activities in soil. *Biologist Fertilizers Soils*, 10: 221-226.
- Pinochet, D.T., Aguirre, J.A. y Quiroz, E.R. 2002. Estudio de la lixiviación de cadmio, mercurio y plomo en suelos derivados de cenizas volcánicas. *Agro Sur*, 30: 51-58.

- Popescu, L. y Stanca, A. 2008. Monitoring of heavy metals soil contents in the area of thermal power plants in Romania. *World Academy Sci., Engineering Technol.*, 20: 382-386.
- Pravin, G., Priti, G., Shaikh, A., Sindha, S., Khan, M.S. 2012. *Sesbania sesban* Linn: A Review on its ethnobotany, phytochemical and pharmacological profile. *Asian J. Biomed. Pharmaceut. Sci.*, 2:11-14.
- Pueyo, M., Mateu, J., Rigol, A., Vidal, M., López-Sánchez, J.F. y Rauret, G. 2008. Use of themodified BCR three-step sequential extraction procedure for the study of trace element dynamics in contaminated soils. *Environ. Pollut.*, 152: 330-341.
- Pulford, I.D., Riddell-Black, D. y Stewart, C. 2002. Heavy metal uptake by willow clones from sewage sludge-treated soil: the potential for phytoremediation. *Int. J. Phytorem.*, 4: 59-72.
- Pulford, I.D. y Watson, C. 2003. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees-a review. *Environ. Int.*, 29: 529-540.
- Punshon, T. y Dickinson, N.M., 1997. Acclimation of *Salix* to metal stress. *New Phytol.* 137: 303-314.
- Rapport, D.J., Regier, H.A. y Hutchinson, T.C. 1985. Ecosystem behavior under stress. *Am. Nat.*, 125: 617-640.
- Raskin, I. y Ensley, B.D. 2000. Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment. JohnWiley & Sons, New York, USA.
- Renella, G., Mench, M., Landi, L., et al. 2005. Microbial activity and hydrolase synthesis in long-term Cd-contaminated soils. *Soil Biol. Biochem.*, 37: 133-139.
- Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 17: 208-212.
- Ricklefs, R.E. 1997. Invitación a la ecología: La economía de la naturaleza. 4ª ed., Ed. Medica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 692 pp.
- Richards, L.A. 1954. Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. USDA Agriculture Handbook 60, Washington D.C., USA.
- Riechaman, MS. 2002. The responses of plants to metals toxicity: A review focusing on cooper, manganese and zinc. Australian Minerals Energy Environ. Foundation, Australia. 54 pp.
- Rillig, M., Wright, S., Nichols, K., Shmith, W. y Torn, M. 2001. Large contributions of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. *Plant Soil*, 233: 167-177.
- Rillig M., Ramsey, P., Morris, S. y Paul, E. 2003. Glomalin, an arbuscular-mycorrhizal fungal soil protein, responds to soil-use change. *Plant Soil*, 253: 293-299.
- Ritz, K. y Trudgill, D.L. 1999. Utility of nematode community analysis as an integrated measure of the functional state of soils: perspectives and challenges. *Plant Soil*, 21: 1-11.
- Rhoades, J.D. y Loveday, J. 1990. Salinity in irrigated agriculture. En: *Irrigation of Agricultural Crops. Agronomy Monograph*, Am. Society Agronomy, 30: 1089-1142.

- Robidoux, P.Y., Gong, P., Sarrazin, M., Bardai, G., Paquet, L., Hawari, J., Dubois, C., Sinha, G.I., y Gupta, A.K. 2005. Translocation of metals from fly ash amended soil in the plant of *Sesbania cannabina* L: Ritz: Effect on antioxidants. *Chemosphere*, 6: 1204-1214.
- Ronkart, S.N., Laurent, V., Carbonnelle, P., Mabon, N., Copin, A. y Barthélemy, J.P. 2007. Speciation of five arsenic species (arsenite, arsenate, MMAAV, DMAAV and AsBet) in different kind of water by HPLC-ICP-MS. *Chemosphere*, 66: 738-745.
- Ruíz-Lozano, J. y Azcón, R. 1995. Hyphal contribution to water uptake in mycorrhizal plants as affected by the fungal species and water status. *Physiol. Plant.*, 95: 472-478.
- Sánchez-Monedero, M.A., Mondini, C., De Nobili, M., Leita, L., y Roig, A. 2004. Land application of biosolids. Soil response to different stabilization degree of the treated organic matter. *Waste Manag.*, 24: 325-332.
- Sandaa, R., Torsvik, A. y Engeré, V. 2001. Influence of long-term heavy-metal contamination on microbial communities in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 33: 287-295.
- Santiago, M. y Santhamani, S. 2010. Remediation of chromium contaminated soils: Potential for phyto and bioremediation. 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World, 2010. Australia.
- Sahi, SV; Israr, M., Srivastava, A.K., Gardea-Torresdey, J.L. y Parsons, J.G. 2007. Accumulation, speciation and cellular localization of cooper in *Sesbania drummondii*. *Chemosphere*, 67: 2257-2266.
- Sandaa, R., Torsvik, A. y Engeré, V. 2001. Influence of long-term heavy-metal contamination on microbial communities in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 33: 287-295.
- Sarret, G., Balesdent, J., Lamia, B., Garnier, J.-M., Marcus, M.A., Geoffroy, N., Panfili, F., y Manceau, A. 2004. Zn speciation in the organic horizon of a contaminated soil by micro-X-ray fluorescence, micro- and powder-EXAFS spectroscopy, and isotopic dilution. *Environ. Sci. Technol.*, 38: 2792-2801.
- Saxena, S. y D'Souza, S.F. 2006. Heavy metal pollution abatement using rock phosphate mineral. *Environ. Int.*, 32: 199-202.
- Seguel, A., Rubio, R., Carrillo, R., Espinosa, A. y Borie, F. 2008. Niveles de glomalina y su relación con características químicas y biológicas del suelo (andisol) en un relicto de bosque nativo del sur de Chile. *Bosque*, 29: 11-22.
- Seguel, A., Meier, S., García, C., Borie, F. y Cornejo, P. 2009. Contribución de la glomalina a la fitoestabilización de suelos contaminados con cobre utilizando *Oenothera Affinis* y hongos micorizico arbusculares. XI Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo, Méjico, 21: 63-64.
- Serrano, S., Garrido, F., Campbell, C.G. y García-González, M.T. 2005. Competitive sorption of cadmium and lead in acid soils of Central Spain. *Geoderma*, 124: 91-104.
- Shanker, A.k., Sudhagar, R. y Pathmanabhan, G. 2003a. Growth, phytochelatin SH and antioxidative response of sunflower as affected by chromium speciation. 2°



- International Congress of plant physiology on sustainable plant productivity under changing environment. New Delhi, India.
- Sharpley, A.N., Daniel, T., Sims, T., Lemunión, J., Stevens, R. y Parry, R. 1999. Agricultural phosphorous and eutrophication, 2nd edition, University Parks, PA, USDA, Agricultural Research Service. 44 pp.
- Shi, W., Bischoff, M., Turco, R., et al. 2002. Long-term effects of chromium and lead upon the activity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecol.*, 21: 169-177.
- Shu, W.S., Ye, Z.H., Lan, C.Y., Zhang, Z.Q. y Wong, M.H. 2001. Acidification of lead/zinc mine tailings and its effect on heavy metal mobility. *Environ. Int.*, 26: 389-394.
- Shukla, O.P., Rai, U.N. y Dubey, S. 2009. Involvement and interaction of microbial communities in the transformation and stabilization of chromium during the composting of tannery effluent treated biomass of *Vallisneria spiralis* L. *Bioresource Technol.*, 100: 2198-2203.
- Silviera, M.L.A., Alleoni, L.R.F. y Guilherme, L.R.G. 2003. Biosolids and heavy metals in soils. *Scientia Agricola*, 60: 793-806.
- Singh, P.K. 2012. Role of glomalin related soil protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi: A Review. *Agricultural Sci. Res. J.*, 2: 119-125.
- Sinha, S. y Gupta, A.K. 2005. Translocation of metals from fly ash amended soil in the plant of *Sesbania cannabina* L. *Ritz*: Effect on antioxidants. *Chemosphere*, 61: 1204-1214.
- Sipos, P., Németh, T., Kis, V.K. y Mohai, I. 2008. Sorption of copper, zinc and lead on soil mineral phases. *Chemosphere*, 73: 461-469.
- Siqueira, J.O., Pouyu, E. Moreira, F.M.S. 1999. Micorrizas arbusculares no crescimento postransplante de mudas de árvores em solo com excesso de metais pesados. *Rev. Bras. Ci. Solo*, 23: 569-580.
- Smith, S. y Gianinazzi-Pearson, V. 1988. Physiological interactions between symbionts in vesicular - arbuscular mycorrhizal plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 39: 221-244.
- Smith, S. 1996. Agricultural recycling of sewage sludge and the environment. CAB International, Wallingford, UK. 382 pp.
- Smith, S.E. y Read, D.J. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*, 2º Ed. Academic Press Ltd., Londres, UK.
- Sobrero, M.C., y Ronco, A. 2004. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lectuca sativa* L.). Pp. 71-79 en: Castillo Morales, G., (Ed.) Ensayos Toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Ottawa, Canadá.
- Song, W-Y., Martinoia, E., Lee, Kim, D., Kim, D-Y., et al. 2004. A novel family of Cys-Rich membrane proteins mediates cadmium resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 135: 1027-1039.
- Sposito, G. 1989. *The Chemistry of Soils*. Oxford University Press, New York, USA. 277 pp.

- Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P. y Jones, D.T. 1994. Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): assessing the environmental impact of point source metal contamination in terrestrial ecosystems. *Environ. Pollut.*, 84: 123-130.
- Srivastava, P., Singh, B. y Angove, M. 2005. Competitive adsorption behavior of heavy metals on kaolinite. *J. Colloid Interface Sci.*, 290: 28-38.
- Stevenson, F.J. 1994. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd ed. John Wiley, New York, USA. 496 pp.
- Suthersan, S.S. 1996. *Remediation Engineering: Design Concepts*. Lewis publishers, CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 384 pp.
- Sverdrup-Thygeson, A. y Lindenmayer, D.B. 2003. Ecological continuity and assumed indicator fungi in boreal forest: The importance of the landscape matrix. *Forest Ecol. Manage.*, 174: 353-363.
- Tang, J., Jingyi, X., Yongsheng, W., Yansheng, L. y Tang, Q. 2012. Effects of high concentration of chromium stress on physiological and biochemical characters and accumulation of chromium in tea plant (*Camellia sinensis* L.). *African J. Biotechnol.*, 11: 2248-2255.
- Tangahu, B.V., Sheikh Abdullah, S.R., Basri, H., Idris, M., Anuar, N. y Mukhlisin, M. 2011. A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *Int. J. Chem. Engin.*, 31 pp.
- Tyler, G., Balsberg-Pahlsson, A.M., Bengtsson, G., Baath, E. y Tranvik, L. 1989. Heavy-metal ecology of terrestrial plants, microorganisms and invertebrates: A review. *Water Air Soil Pollut.*, 47: 189-215.
- Teaca, C.A. y Bodirlau, R. 2008. Assessment of toxicity of industrial wastes using crop plant assays. *Bioresources*, 3: 1130-1145.
- Tortosa, R.D. 1983. El género *Discaria* (*Rhamnaceae*). *Bol. Soc. Argent. Bot.*, 22: 301-335.
- Torri, S.I. y Lavado, R.S. 2008. Zinc distribution in soils amended with different kinds of sewage sludge. *J. Environ. Manag.*, 88: 1571-1579.
- Torri, S.I. y Lavado, R.S. 2009. Plant absorption of trace elements in sludge amended soils and correlation with soil chemical speciation. *J. Hazard. Mater.*, 166: 1469-1465.
- Torstensson, L. 1997. Microbial assays in Soil. *Soil Ecology*, pp 207-233.
- Tripathi, R.D., Vajpayee, P., Singh, N., Rai, U.N., Kumar, A., Ali, M.B., Kumar, B. y Yunus, M. 2004. Efficacy of various amendments for amelioration of fly ash toxicity: growth performance and metal composition of *Cassia siamea* Lamk. *Chemosphere*, 54: 1581-1588.
- Tume, P., Bech, J., Longan, L., Tume, L., Reverter, F. y Sepulveda, B. 2006. Trace elements in natural surface soils in Sant Climent (Catalonia, Spain). *Ecol. Eng.*, 27: 145-152.
- Unión Europea Council of the European Communities (UECEC). 1986. Council directive on the protection of the environment, and in particular of the soil when sewage sludge is used in agriculture, pp. 126-129, 86/278/EEC. Luxemburg, UECEC.

- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). 1995. Standards for the use or disposal of Sewage sludge. Fed. Reg.. 54764–54770. Washington, DC, USA. 60 pp.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). 2000. Introduction to phytoremediation. Tech. Rep. EPA 600/R-99/107, United States Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Cincinnati, Ohio, USA.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). 2008. Ireland's Environment 2008: Chapter 12. Soil. State of the Environment Report. 294 pp.
- Urzelai, A., Hernandez, A.J. y Pastor, J. 2000. Biotic indices based on soil nematode communities for assessing soil quality in terrestrial ecosystems. *Sci. Total Environ.*, 247: 253-261.
- Uwumarongie-Ilori, E.G., Aisueni, N.O., Sulaiman-Ilobu, B.B., Ekhaton, F., Eneje, R.C. y Efetie-Osie, A. 2012. Immobilization effect of cow dung on lead and chromium in soil cultivated with oil palm. *Bull. Environ. Pharmacol. Life Sci.*, 1: 74-80.
- Valentine, R.C. 1961. Contrast enhancement in the electron microscopy of viruses. *Adv. Virus Res.*, 8: 287-318.
- Valsechi, G., Gicliotti, C. y Farini, A. 1996. Microbial biomass, activity, and organic accumulation in soils contaminated with heavy metals. *Biol. Fert. Soils*, 20: 253-259.
- Van Kamp, I., Leidelmeijer, K., Marsmana, G. y de Hollander, A. 2003. Urban environmental quality and human wellbeing. Towards a conceptual frame-work and demarcation of concepts; a literature study. *Landscape Urban Plan.*, 65: 5-18.
- Van Oort, F., Jongmans, A.G., Citeau, L., Lamy, I. y Chevallier, P. 2006. Micro-scale Zn and Pb distribution patterns in subsurface soil horizons: an indication for metal transport dynamics. *European J. Soil Sci.*, 57: 154-166.
- Van Voorhies, W.A. y Ward, S. 1999. Genetic and environmental conditions that increase longevity in *Caenorhabditis elegans* decrease metabolic rate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 11399-11403.
- Vangronsveld, J., Van Assche, F. y Clijsters, H. 1991. Reclamation of a 'desert like' site in the North east of Belgium: Evolution of the metal pollution and experiments in situ. Pp. 58-61 en Farmer JG (Ed.) P. Int. Conference Heavy Metals Environ. Belgica.
- Vangronsveld, J., Van Assche, F., Sterckx, J. y Clijsters, H. 1993. Rehabilitation studies on an old non-ferrous waste dumping ground: effects of metal immobilization and revegetation. Pp. 563-566 en Allen RJ y JO Nriagu (Eds.) P. Int. Conference Heavy Metals Environ. Bélgica.
- Vangronsveld, J., Van Assche, F., Sterckx, J. y Clijsters, H. 1995. Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: In situ metal immobilization and fixation. *Environ. Pollut.*, 87: 51-59.
- Varnero, M.T., Rojas, C.A. y Orellana, R.R. 2007. Índices de fitotoxicidad en residuos orgánicos durante el compostaje. *Suelo Nutr. Veg.*, 7: 28-37.

- Vatamaniuk, O.K., Bucher, E.E., Ward, J.T. y Rea, P.A. 2001. Worms take the 'phyto' out of "phytochelatins". Trends in Biotechnol., 20: 61–64.
- Veasey, E.A., Organo Negro, M., Sodero Martins, P. y Bandel, G. 1999. Early growth and seedling morphology of species of *Sesbania scop.* (Leguminosae, Robinieae). Sci. Agric., 56: 1-10.
- Vega, F.A., Covelo, E.F. y Andrade, M.L. 2006. Competitive sorption and desorption of heavy metals in mine soils: influence of mine soil characteristics. J. Colloid Interface Sci., 298: 582-592.
- Vilela de Resende, A., Furtini Neto, A.E., Curi, N., Muniz, J.A. y de Faria, M.R. 2000. Acumulo e eficiencia nutricional de macronutrientes por especies florestais de diferentes grupos sucessionais em desposta afertilizacão fosfatada. Cienc. Agrotec., 24: 160-173.
- Vodnik, D., Grčman, H., Maček, I., van Elteren, J.T. y Kovačević, M. 2008. The contribution of glomalin-related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil. Sci. Total Environ., 392: 130-136.
- Wang, W. 1991. Literature review on higher plants for toxicity testing. Water, Air, Soil Pollut., 59: 381-400.
- Wang, P., Qu, E.; Li, Z. y Shuman, L.M. 1997. Fractions and availability of nickel in loessial soil amended with sewage or sewage sludge. J. Environ. Qual., 26: 795-801.
- Wang, Y.P., Shi, J.Y., Lin, Q., Chen, X.C. y Chen, Y.X. 2007. Heavy metal availability and impact on activity of soil microorganisms along a Cu/Zn contamination gradient. J. Environm. Sci., 19: 848-853.
- Wang, B., Xie, Z., Chen, J., Jiang, J. y Su, Q. 2008. Effects of field application of phosphate fertilizers on the availability and uptake of lead, zinc and cadmium by cabbage (*Brassica chinensis L.*) in a mining tailing contaminated soil. J. Environ. Sci., 20: 1109-1117.
- Walker, D.J., Clemente, R. Roig, A. y Bernal, M.P. 2003. The effects of soil amendments on heavy metal bioavailability in two contaminated Mediterranean Soils. Environ. Poll., 122: 303-312.
- Waterlot, C., Pruvot, C., Ciesielski, H. y Douay, F. 2011. Effects of a phosphorus amendment and the pH of water used for watering on the mobility and phytoavailability of Cd, Pb and Zn in highly contaminated kitchen garden soils. Ecological Engineering, 37: 1081-1093.
- Warman, P.R. 1999. Evaluation of seed germination and growth test for assessing compost maturity. Compost Sci. Util., 7: 33-37.
- Wasilewska, L. 1997a. The relationship between the diversity of soil nematode communities and the plant species richness of meadows. Ekol. Polska, 45: 719-732.
- Wasilewska, L. 1997b. Soil invertebrates as bioindicators, with special reference to soil-inhabiting nematodes. Russian J. Nematol., 5: 113-126.
- Watson, C., Pulford, I.D. y Riddell-Black, D. 1999. Heavy metal toxicity responses of two willow (*Salix*) varieties grown hydroponically: development of a tolerance screening test. Environ. Geochem. Health, 21: 359-354.

- Wei, C.Y., Wang, C., Sun, X. y Wang, W.Y. 2007. Arsenic accumulation by ferns: a field survey in southern China. *Environ. Geochem. Health*, 29: 169-177.
- Wei, S.H., Silva, J.A.T. y Zhou, Q.X. 2008. Agro-improving method of phytoextracting heavy metal contaminated soil. *J. Hazard Mater.*, 150: 662-668.
- Weiss, D. y Haley, A.A. 1991. The role of light reactions in the regulation of anthocyanin synthesis in *Petunia corollas*. *Physiol. Plant*, 81: 127-133.
- Weiss, J., Miki, H., David, B. y Michael, S. 2006. Laboratory study of heavy metal phytoremediation by three wetland macrophytes. *Int. J. Phytoremed.*, 8: 245-259.
- Welp, G. y Brümmer, G.W. 1999. Adsorption and solubility of ten metals in soil samples of different composition. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 162: 155-161.
- Wright, S.F., Upadhyaya, A. 1996. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Sci.*, 161: 575-586.
- Wright, S.F. y Upadhyaya, A. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil*, 198: 97-107.
- Wright, J., Rice, K.R., Murphy, B. y Conca, J.L. 2004a. PIMS using apatite IITM: how to works to remediate soil and water. En: *Proceedings of the conference on sustainable range management*, Battelle Press, Columbus, OH, USA.
- Williams, A.G.B., Scheckel, K.G., McDermott, G. Gratson, D., Neptune, D. y Ryan, J.A. 2011. Speciation and bioavailability of zinc in amended sediments. *Chem. Spec. Bioavail.*, 23: 143-154.
- Wong, M.H., Cheung, K.C. y Lan, C.Y. 1992. Factors related to the diversity and distribution of soil fauna on Gin Drinkers Bay landfill. *Waste Manage. Res.*, 10: 423-434.
- Xia, H. y Ma, X. 2006. Phytoremediation of ethion by water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) from water. *Bioresource Technol.*, 97: 1050-1054.
- Yang, J., Mosby, D.E., Casteel, S.W. y Blancher, R.W. 2001. Lead immobilization using phosphoric acid in smelter-contaminated urban oil. *Environ. Sci. Technol.*, 35: 3553-3559.
- Yang, B., Shu, W.S., Ye, Z.H., Lan, C.Y., y Wong, M.H. 2003. Growth and metal accumulation in vertiver and two *Sesbania* species on lead/zinc mine tailings. *Chemosphere*, 52: 1593-1600.
- Ye, Z.H., Yang, Z.Y., Chan, G.Y.S. y Wong, M.H. 2001. Growth response of *Sesbania rostrata* and *Sesbania cannabina* to sludge-amended lead/zinc mine tailings: A greenhouse study. *Environ. Int.*, 26: 449-455.
- Yeates, G.W., Bongers, T. de Goede, R.G., Freckman, D.W. y Georgieva, S.S. 1993. Feeding habits in soil nematode families and genera – an outline for soil ecologists. *J. Nematol.*, 25: 315-331.
- Yeates, G.W., Orchard, V.A. y Speir, T.W. 1995. Reduction in faunal populations and decomposition following pasture contamination by a Cu-Cr-As based timber preservative. *Acta Zool. Fennica*, 196: 297-300.

- Yeates, G.W. y Bongers, T. 1999. Nematode diversity in agroecosystems. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 74: 113-135.
- Yoon, J., Cao, X., Zhou, Q., Ma, L.Q. 2006. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Sci. Total Environ.*, 368: 456-464.
- Zhang, P. y Ryan, J.A. 1999. Transformation of Pb(II) from cerrusite to chloropyromophite in the presence of hydroxyapatite under varing condition of pH. *Environ. Sci. Technol.*, 33: 625-630.
- Zeng, F., Ali, S., Zhang, H., Ouyang, Y., Qiu, B., Wu, F. y Zhang, G. 2011. The influence of pH and organic matter content in paddy soil on heavy metal availability and their uptake by rice plants. *Environ. Pollut.*, 159: 84-91
- Zhang, S., Mingying, C., Li, T., Xu, X. y Deng, L. 2010. A newly found cadmium accumulator - *Malva sinensis Cavan.* *J. Hazard. Mater.*, 173: 705-709.
- Zhu, Y.L., Zayed, A.M., Qian, J.H., Souza, M., y Terry, N., 1999. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: II. Water hyacinth. *J. Environ. Qual.*, 28, 339-344.
- Zubillaga, M.S. y Lavado, R.S. 2002. Heavy metal content in lettuce plants grown in biosolids compost. 2001. *Compost Sci. Utilization*, 10: 363-367.
- Zubillaga, M.S., Torri, I.S. y Lavado, R.S. 2006. Remediación de suelos contaminados con elementos traza mediante el uso de biosólidos compostados y enmienda calcárea. I) efecto sobre la disponibilidad de Cd y Zn. *Revista Fac. Agr. (UBA)*, 26: 87-92.
- Zubillaga, M.S. y Lavado, R.S. 2006. Phytotoxicity of biosolids compost at different degrees of maturity compared to biosolids and animal manures. *Compost Sci. Util.*, 14: 267-270.
- Zubillaga, M.S., Bressan, E., y Lavado, R.S. 2012. Effects of phytoremediation and application of organic amendment on the mobility of heavy metals in a polluted soil profile. *Inter. J. Phytoremediation*, 14: 212-220.
- Zuconì, F., Pera, A., Forte, M.E. y de Bertoldi, M. 1981. Evaluating toxicity of immature compost. *BioCycle*, 22: 54-57.
- Zuconì, F., Monaco, A., Foret, M. y de Bertoldi, M. 1985. Phytotoxins during the stabilization of organic matter. Pp. 73-486 en Gasser, J.K.L. (Ed.) *Composting of Agricultural and Other Wastes*. Elsevier Applied Science Publishers, New York, USA.
- Zuconì, F. y de Bertoldi, M. 1987. Compost specifications for the production and characterization of compost from municipal solid waste. Pp. 30-50 en M de Bertoldi; MP Ferranti; P L'Hermite; F Zuconì (Eds.) *Compost: Production, Quality and Use*. Elsevier Applied Science, Essex. USA.